

**Universidad Autónoma Metropolitana
UNIDAD AZCAPOTZALCO**



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE MATERIALES

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA MELATONINA SOBRE
ELECTRODOS DE CARBONO PARA SU CUANTIFICACIÓN**

Tesis que presenta

Alejandrina Zafra Roldán

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias e Ingeniería de Materiales

Asesoras

Dra. Silvia Corona Avendaño

Dra. Ma. Teresa Ramírez Silva

Abril 2018

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (176668) otorgada para realizar mis estudios de doctorado, así como por la beca para complementar este trabajo (proyecto 237327). La Dra. María Teresa Ramírez Silva reconoce a CONACyT por el proyecto 237327.

A la UAM-Azcapotzalco por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. Agradezco en especial a los profesores del Área de Ingeniería de Materiales por sus aportaciones y conocimientos compartidos, así como por brindarme un espacio en el Laboratorio Interdisciplinario de Electroquímica e Ingeniería de Materiales para la realización de este trabajo. Al Área de Química Analítica de la UAM-Iztapalapa por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de la experimentación de este trabajo.

A mis asesoras Dra. Ma. Teresa Ramírez Silva y Dra. Silvia Corona Avendaño por su tiempo, aportaciones y su infinita paciencia para la elaboración de este trabajo. Gracias por su apoyo y sus enseñanzas siempre dirigidas a mejorar mi formación como investigadora.

A la Dra. Dafne Sarahia Guzmán Hernández y el Dr. Gerardo Vázquez Huerta, por su disposición y enseñanzas para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Manuel Palomar Pardavé y Mario Romero Romo por su interés y seguimiento en el desarrollo de este proyecto. Agradezco su tiempo y observaciones en la revisión del artículo.

Al comité del Jurado: Dra. Gabriela Roa Morales, Dra. María Teresa Ramírez Silva, Dra. Dafne S. Guzmán Hernández, Dr. Manuel Palomar Pardavé y Dr. Gerardo Vázquez Huerta; por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, así como por sus sugerencias para mejorarla.

A Dios y a los Seres de Luz por esta vida llena de bendiciones y amor, por la oportunidad de seguir aprendiendo y evolucionando.

A mi mamá Socorro y hermanas Lilia y Enriqueta, por todo el amor y apoyo que me brindan día con día. Siento una gran admiración por ustedes, son un ejemplo de fortaleza y superación para mí. Agradezco a Marco su apoyo, por ser parte de mi Familia; así como a mis sobrinas Alejandra y Carolina, por la alegría que me da su sola existencia.

A Guillermo por todo todas las vivencias y amor compartido, porque siempre me animaste y apoyaste a superarme académicamente.

A mis compañeros del laboratorio que son como mi segunda Familia: Ivone, Noemi, Edelmira, Alejandro, Iván, Carlos Ernesto, Selene, en especial a Yessica, Crystal De Rosa, Selene Irisais, Regino y Giovanni por su amistad, cariño, apoyo y estar conmigo en todo momento.

A la Dra. Silvia por su amistad, consejos, ánimos y por creer en mí. Admiro tu inteligencia, dedicación y disciplina, pero sobre todo su optimismo para enfrentar la vida.

A la Dra. Lidice, Dr. Jorge y Karina por sus ánimos, consejo y amistad incondicional.

A mis compañeros de departamento Gerardo y Marcos por hacer mi estancia más agradable.

Resumen

En este trabajo se presenta el estudio del comportamiento espectrofotométrico y electroquímico de la melatonina MT, la cual es una importante neurohormona para el organismo humano y cuya deficiencia interfiere principalmente con el sueño, provocando padecimientos como ansiedad, depresión y enfermedades neurodegenerativas; una alternativa ideal para su determinación es el uso de las técnicas electroquímicas, debido a su rapidez en la adquisición de datos, su bajo costo y fácil manejo, es por ello que en este trabajo se construyó un electrodo de pasta de carbono, EPC, modificado con nanopartículas de oro sintetizadas con β -ciclodextrina, NPsAu• β CD. Para tal fin, se inició con una caracterización espectrofotométrica de la melatonina, en la que se llevaron a cabo estudios de estabilidad, a partir de los cuales se establecieron las condiciones de trabajo; mediante esta misma técnica y utilizando el programa computacional *Stability quotients from absorbance data*, SQUAD, se obtuvieron los valores de las constantes de acidez 5.772 ± 0.011 y 10.201 ± 0.024 , con los cuales fue posible establecer el pH de estudio. Dado que la β -ciclodextrina, β CD, tiene la capacidad de formar complejos de inclusión con diversas moléculas, una vez establecidas las condiciones de trabajo y el pH de estudio, se analizaron las interacciones entre la MT y β CD, en donde se comprobó la formación del complejo de inclusión entre estas moléculas y se calculó su constante de formación, mediante espectrofotometría UV-Vis y voltamperometría cíclica, VC, obteniendo valores de $\log \beta_1 = (3.07 \pm 0.06) \text{ M}^{-1}$ y $\beta_1 = (3.15 \pm 0.01) \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Confirmada la formación del complejo, se prosiguió con la construcción de los EPC, modificando su superficie con nanopartículas de oro, NPsAu, así como con β CD y NPsAu• β CD por electropolimerización. Posteriormente, se realizó la caracterización de los electrodos, mediante VC, de los cuales se obtuvieron los valores de la capacitancia $0.019 \times 10^{-4} \text{ F}$, $4.428 \times 10^{-4} \text{ F}$ y $7.658 \times 10^{-4} \text{ F}$ del EPC sin modificar, modificado con β CD y NPsAu• β CD, respectivamente; los cuales se corroboraron utilizando la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, EIE, dando valores de $0.010 \times 10^{-4} \text{ F}$, $2.088 \times 10^{-4} \text{ F}$ y $5.098 \times 10^{-4} \text{ F}$, respectivamente. Estos resultados indican que el área expuesta para el EPC modificado con NPsAu• β CD es mayor, como se pudo corroborar mediante estudios de VC en donde se varió la velocidad de barrido de potencial en un sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, obteniendo valores del área electroactiva, A_0 , de 0.1385 cm^2 , 0.2452 cm^2 y 0.2522 cm^2 , para EPC, EPC- β CD y EPC-NPsAu• β CD respectivamente. En este sentido, se caracterizó la polimerización de las NPsAu• β CD bajo la influencia de diferentes factores; encontrando que el proceso de adsorción y crecimiento del polímero sobre un EPC, se favorece al aumentar el número de ciclos aplicados, el potencial de inversión y la concentración de H^+ ; comportamiento similar al de la β CD sin NPsAu. Caracterizados los

distintos electrodos, se continuó con el estudio del comportamiento electroquímico de la MT mediante VC, donde los resultados mostraron que el mecanismo redox de la MT es electroquímico-químico-electroquímico, EQE, que el proceso de oxidación de la MT está controlado por la difusión y no se ve afectado por la posible formación de subproductos. Mediante las técnicas de voltamperometría de corriente muestreada y diferencial de pulso, se calculó el número de electrones involucrados en el proceso de oxidación de la MT, $n = 1$. Empleando las técnicas de voltamperometría cíclica y cronoamperometría en estado estacionario, se estimó el coeficiente de difusión, D , obteniendo valores de $(4.5437 \pm 0.2159) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ y $(4.6452 \pm 0.2135) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, respectivamente. Valores, que se corroboraron mediante la técnica de voltamperometría lineal de disco rotatoria en condiciones de convección forzada, VL-DR, en donde se estimó un D de $(5.4193 \pm 0.2634) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Para analizar la influencia de las NPsAu, β CD y NPsAu• β CD al usarse en la modificación del EPC, sobre el comportamiento electroquímico de la MT, se realizaron diversos estudios mediante VC, en donde se varió la velocidad de barrido. Los resultados mostraron, un incremento en la corriente de la señal correspondiente a la oxidación de la MT 3 y 5 veces mayor al modificar el EPC con 15 y 25 ciclos de β CD, respectivamente; mientras que el aumento es 7 y 13 veces mayor al modificar el EPC con 15 y 25 de NPsAu• β CD, respectivamente; mejorando la sensibilidad del electrodo hacia la MT. El pico correspondiente a la señal de oxidación de la MT se presenta a potenciales menores y con una mayor definición cuando se usa un EPC modificado, favoreciendo la reacción e incrementando la selectividad del electrodo. La modificación del EPC con 15 y 25 ciclos de β CD o NPsAu• β CD, ocasiona que el proceso de oxidación de la MT controlado por la difusión, sea un proceso mixto; comportamiento que se atribuyó a la formación del complejo de inclusión entre la MT y la β CD. Habiendo estudiado el comportamiento químico y electroquímico de la MT, se prosiguió a la obtención de un método para su determinación cuantitativa. Mediante las técnicas de voltamperométricas cíclica y diferencial de pulso, fue posible construir diferentes curvas de calibración, donde la sensibilidad tiene la siguiente tendencia de acuerdo al electrodo empleado: $\text{EPC} < \text{EPC-}\beta\text{CD} < \text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$. Los resultados mostraron que los métodos electroquímicos son una buena alternativa en la determinación de la MT. Finalmente, se estudió el comportamiento electroquímico de la MT en presencia de la Lavodopa, LD, otro importante neurotransmisor esencial para la síntesis de diversos neurotransmisores. Ambos neurotransmisores, coexisten en el mismo sistema biológico y su producción está íntimamente ligadas. Al usar un EPC se encontró que las señales se traslapan; sin embargo, al modificar el electrodo con β CD se lograron separar estas.

Abstract

This work presents the results obtained from the spectrophotometric and electrochemical study of the behavior of melatonin, MT, that is an important neurohormone for human organism, the deficiency of which interferes mainly with sleep, provoking mental health conditions like anxiety and depression, and neurodegenerative illnesses. The electrochemical methods are presently known to be the more adequate alternative to quantify the neurohormone, because of features like: inherent rapid data acquisition, setting up and working with facility, added to appreciable reproducibility and repeatability, and relatively low operating costs. Therefore, in this work a carbon paste electrode was manufactured, EPC, modified with gold nanoparticles synthesized with β -cyclodextrin, AuNPs• β CD. Therefore, the spectrophotometric melatonin characterization marked the initial relevant methodology step, that led to understanding the stability of the solutions from which the subsequent working conditions would follow. As relevant outcome, the use of *Stability quotients from absorbance data*, SQUAD, software allowed obtaining the values of the melatonin acidity constants, that were: 5.772 ± 0.011 and 10.201 ± 0.024 . These served to establish the studies pH. Since the β -cyclodextrin, β CD, exhibits the capacity to form inclusion complexes with diverse molecules. Once the working conditions had been established together with the studies pH, the MT and β CD interactions were investigated, from which it was found out that formation of the complex between these two molecules had a formation constant that was determined through UV-Vis spectrophotometry and cyclic voltammetry, CV, that rendered the following: $\log \beta_1 = (3.07 \pm 0.06) \text{ M}^{-1}$ and $\beta_1 = (3.15 \pm 0.01) \text{ M}^{-1}$, respectively. Once the complex formation was verified, it followed the manufacture of the carbon paste electrode, along with its surface modification with gold nanoparticles, AuNPs, and with β CD plus AuNPs• β CD through electropolymerization. After, the electrodes were characterized by means of CV, from which the following capacitance values were obtained: $0.019 \times 10^{-4} \text{ F}$, $4.428 \times 10^{-4} \text{ F}$ and $7.658 \times 10^{-4} \text{ F}$ of the EPCs as: unmodified, modified with β CD and modified with AuNPs• β CD, respectively. These values were corroborated through electrochemical impedance spectroscopy, EIS, that gave the following $0.010 \times 10^{-4} \text{ F}$, $2.088 \times 10^{-4} \text{ F}$ and $5.098 \times 10^{-4} \text{ F}$, values respectively. These results suggest that the NPsAu• β CD-modified CPE exposed area was larger, as corroborated by means of CV studies where the potential scan rate varied in the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ system, that led to assessments of the electroactive area, A_0 , of 0.1385 cm^2 , 0.2452 cm^2 and 0.2522 cm^2 , for CPE, CPE- β CD and CPE-NPsAu• β CD, respectively. In this respect, polymerization with the NPsAu• β CD under the influence of various factors was characterized, whereby the adsorption and growth processes of the polymer over a CPE was favored by an increasing number of applied cycles, the inversion potential and pH; this a behavior is similar to that of the β CD without NPsAu. Subsequent to characterization of the different electrodes, the characterization of MT through

CV, allowed establishing that its redox mechanism was of the electrochemical-chemical-electrochemical type, ECE, and that the MT oxidation process is diffusion-controlled, not being affected by formation of possible byproducts. The number of electrons involved during the MT oxidation process was assessed from the results of sampled current and differential pulse voltammetries, $n = 1$. The diffusion coefficient, D , was estimated through CV and steady state chronoamperometry as $(4.5437 \pm 0.2159) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ and $(4.6452 \pm 0.2135) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, respectively, which were corroborated through rotating disk linear voltammetry, RD-LV, under forced convection, that allowed an estimation of $D = (5.4193 \pm 0.2634) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. In order to find out about the influence of the NPsAu, β CD and NPsAu• β CD as CPE modifiers when focusing on the MT electrochemical behavior, the CV studies were carried out as a function of the potential scan rate. The results showed an MT oxidation current increased three to five times after modifying the CPE with 15 and 25 β CD cycles, respectively, whereas such an increase was 7 to 13 times larger after modifying the CPE with the same, 15 and 25 NPsAu• β CD cycles, respectively; this implies a significant electrode sensitivity improvement toward MT. The CPE modification allowed better shape definition of a MT oxidation peak that shifted to smaller potentials, this is, the reaction was favored and so it was the electrode selectivity. The CPE modification with 15 and 25 β CD or NPsAu• β CD cycles provokes that the diffusion-controlled MT oxidation process after either modification becomes a mixed process, which was attributed to formation of an inclusion complex between the MT and the β CD. Now, after studying the chemical and electrochemical MT behavior, it was relevant to proceed to its quantitative determination. CV and DPV allowed recording the calibration plots, where the sensitivity trend is associated to modification of the electrodes as follows: $\text{CPE} < \text{CPE-}\beta\text{CD} < \text{CPE-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$. The results proved that the electrochemical methods are a reliable inexpensive alternative to determine MT. Lastly, the electrochemical behavior of MT in the presence of Levodopa, LD, another important neurotransmitter essential for the synthesis of other. Both MT and LD coexist in the same biological system and their production are intimately associated. When using a CPE the signals from both overlap, however, after modification of the electrode with β CD the signals had become separated.

Índice

AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
ACRÓNIMOS	<i>x</i>
I. INTRODUCCIÓN	<u>1</u>
I.1 REFERENCIAS	3
II. OBJETIVOS	<u>6</u>
II.1 OBJETIVO GENERAL	6
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
CAPÍTULO 1. MELATONINA Y ELECTRODOS MODIFICADOS	<u>7</u>
1.1 IMPORTANCIA DE LA MELATONINA	7
<i>1.1.1 Neurotransmisores</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Síntesis de la Melatonina</i>	<i>9</i>
<i>1.1.3 Melatonina</i>	<i>11</i>
<i>1.1.3.1 Usos de la melatonina</i>	<i>11</i>
<i>1.1.3.2 La melatonina como removedor de radicales libres y antioxidante</i>	<i>12</i>
<i>1.1.4 Técnicas utilizadas para su determinación</i>	<i>13</i>
1.2 ELECTRODOS MODIFICADOS, β-CICLODEXTRINA Y NANOPARTÍCULAS DE Au	18
<i>1.2.1 Electrodo</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2 Electrodo de pasta de carbono</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3 β-ciclodextrina</i>	<i>20</i>
<i>1.2.4 Nanopartículas de Oro</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5 Nanopartículas de Oro con β-ciclodextrina</i>	<i>24</i>
1.3 CONCLUSIONES	27
1.4 REFERENCIAS	27
CAPÍTULO 2. COMPORTAMIENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA MELATONINA	<u>34</u>
2.1 METODOLOGÍA	35
<i>2.1.1 Reactivos</i>	<i>35</i>
<i>2.1.2 Instrumentación</i>	<i>35</i>

2.2 RESULTADOS	35
2.2.1 Estudio espectrofotométrico en función del tiempo	35
2.2.1.1 Sin mantener una atmósfera de N ₂ y sin proteger de la luz al sistema	35
2.2.1.2 Manteniendo una atmósfera de N ₂ y protegiendo de la luz al sistema	36
2.2.2 Determinación de las constantes de acidez	38
2.2.3 Variación de la concentración de la especie de la MT mediante espectrofotometría	44
2.3 CONCLUSIONES	46
2.4 REFERENCIAS	47

CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE LA MELATONINA Y LA β -CICLODEXTRINA

48

3.1 METODOLOGÍA	49
3.1.1 Reactivos	49
3.1.2 Instrumentación	49
3.2 RESULTADOS	50
3.2.1 Determinación de log K del complejo de inclusión de la MT y la β CD mediante espectrofotometría UV-Vis	50
3.2.2 Determinación de log K del complejo de inclusión de la MT y la β CD mediante voltamperometría cíclica	58
3.3 CONCLUSIONES	60
3.4 REFERENCIAS	61

CAPÍTULO 4. SÍNTESIS DE NPsAu, CONSTRUCCIÓN Y MODIFICACIÓN DE LOS EPC

63

4.1 METODOLOGÍA	64
4.1.1 Reactivos	64
4.1.2 Instrumentación	65
4.1.3 Síntesis y caracterización de las NPsAu	65
4.1.4 Síntesis y caracterización de las NPsAu• β CD	68
4.1.5 Construcción y modificación de EPC	70
4.1.5.1 Construcción del EPC	70
4.1.5.2 Modificación del EPC con NPsAu	70
4.1.5.3 Modificación del EPC con β CD	71
4.1.5.4 Modificación del EPC con NPsAu• β CD	71
4.2 RESULTADOS	72
4.2.1 Perfil electroquímico del EPC y del EPC modificado con NPsAu	72
4.2.2 Perfil electroquímico del EPC modificado con β CD	73
4.2.3 Perfil electroquímico del EPC modificado con NPsAu• β CD	75
4.2.5 Comparación del perfil electroquímico del EPC sin modificar y modificado	78
4.3 CONCLUSIONES	79
4.4 REFERENCIAS	80

**CAPÍTULO 5. CÁLCULO DE LA CAPACITANCIA Y ÁREA ELECTROACTIVA DE LOS EPC Y
CARACTERIZACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN DE LAS NPsAu• β CD** **81**

5.1 METODOLOGÍA	82
5.1.1 Reactivos	82
5.1.2 Instrumentación	83
5.2 RESULTADOS	83
5.2.1 Cálculo de la capacitancia y del área electroactiva del EPC sin modificar y modificado con β CD y NPsAu• β CD	83
5.2.1.1 Cálculo de la Capacitancia	83
5.2.1.2 Cálculo del área electroactiva	88
5.2.2 Caracterización electroquímica de la polimerización de las NPsAu• β CD sobre el EPC	91
5.2.2.1 Modificación electroquímica del EPC con NPsAu• β CD	91
5.2.2.2 Efecto del número de ciclos	93
5.2.2.3 Efecto de la ventana de potencial	94
5.2.2.4 Efecto de la concentración del HClO_4	95
5.3 CONCLUSIONES	96
5.4 REFERENCIAS	97

CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MELATONINA EMPLEANDO UN EPC **98**

6.1 METODOLOGÍA	99
6.1.1 Reactivos	99
6.1.2 Instrumentación	99
6.2 RESULTADOS	100
6.2.1 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC	100
6.2.2 Estudio de voltamperometría cíclica de la MT sobre un EPC renovando y sin renovar la superficie	104
6.2.3 Cálculo del coeficiente de difusión en condiciones estáticas	107
6.2.3.1 Estudio de voltamperometría cíclica	107
6.2.3.2 Estudio cronoamperométrico	109
6.2.4 Cálculo del número de electrones	111
6.2.4.1 Voltamperometría de corriente muestreada	111
6.2.4.2 Voltamperometría diferencial de pulso	113
6.2.5 Cálculo del coeficiente de difusión en condiciones de convección forzada	115
6.2.5.1 Voltamperometría lineal de disco rotatorio	115
6.3 CONCLUSIONES	118
6.4 REFERENCIAS	118

**CAPÍTULO 7. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA MELATONINA USANDO EPC
MODIFICADOS** **120**

7.1 METODOLOGÍA	121
7.1.1 Reactivos	121
7.1.2 Instrumentación	121
7.2 RESULTADOS	122

7.2.1 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC-NPsAu	122
7.2.2 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC-βCD	124
7.2.3 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC-NPsAu•βCD	129
7.3 CONCLUSIONES	134
7.4 REFERENCIAS	135
 CAPÍTULO 8. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA MT EN MUESTRAS SINTÉTICAS	 136
 8.1 METODOLOGÍA	 136
8.1.1 Reactivos	136
8.1.2 Instrumentación	137
8.2 RESULTADOS	137
8.2.1 Estudio de voltamperometría cíclica	137
8.2.1.1 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC	137
8.2.1.2 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC-βCD	139
8.2.1.3 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC- NPsAu•βCD	143
8.2.2 Estudio de voltamperometría diferencial de pulso	147
8.2.2.1 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC	147
8.2.2.2 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC-βCD	149
8.2.2.3 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC-NPsAu•βCD	151
8.3 CONCLUSIONES	155
8.4 REFERENCIAS	156
 CAPÍTULO 9. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA LEVODOPA Y MELATONINA	 157
 9.1 METODOLOGÍA	 157
9.1.1 Reactivos	157
9.1.2 Instrumentación	158
9.2 RESULTADOS	158
9.2.1 Estudio de voltamperometría cíclica usando un EPC	158
9.2.1.1 Estudio de VC de la LD variando la velocidad sobre un EPC	158
9.2.1.2 Estudio de VC de la LD variando su concentración sobre un EPC	160
9.2.1.3 Comportamiento electroquímico de la MT y LD sobre un EPC	162
9.2.2 Estudio de voltamperometría cíclica usando un EPC-βCD	163
9.2.2.1 Estudio de VC de la LD variando la velocidad sobre un EPC-βCD	163
9.2.2.2 Estudio de VC de la LD variando su concentración sobre un EPC-βCD	166
9.2.2.3 Comportamiento electroquímico de la MT y LD sobre un EPC	168
9.2.2 Estudio de voltamperometría diferencial de pulso usando un EPC-βCD	170
9.3 CONCLUSIONES	172
9.4 REFERENCIAS	172
 CONCLUSIONES GENERALES	 174
 PERSPECTIVAS FUTURAS	 176
 ANEXO A. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis Y SQUAD	 177

A.1 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE	177
<i>A.1.1 Resonancia del plasmón superficial</i>	<i>178</i>
A.2 SQUAD	179
A.3 REFERENCIAS	181
 ANEXO B. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS	 182
 B.1 FUNDAMENTOS	 182
B.2 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	186
B.3 VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO	188
B.4 VOLTAMPEROMETRÍA LINEAL DE DISCO ROTATORIO	191
B.5 CRONOAMPEROMETRÍA	193
B.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA	195
B.7 REFERENCIAS	197

Acrónimos

A_b	Absorbancia
A	Área electroactiva del electrodo
AA	Ácido ascórbico
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
AG	Ácido glutámico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
AU	Ácido úrico
A5-HIA	Ácido 5-hidroxiindolacético metabolito de la serotonina
b	Longitud de la trayectoria que la luz atraviesa por la muestra
C	Concentración
CA	Cronoamperometría
C_p	Capacitancia
CF	Cafeína
CV	Carbón Vulcan XC-72R
D	Coefficiente de difusión
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético metabolito del a dopamina
ΔE	Amplitudes de pulso
E	Potencial
E_0	Potencial de inicio
$E_{1/2}$	Potencial de onda media
E_λ	Potencial de inversión
EAu	Electrodo de Oro
ECV	Electrodo de Carbón vítreo
ED	Electrodo de diamante
EIE	Espectroscopia de impedancia electroquímica
EP	Adrenalina o Epinefrina
E_{pa}	Potencial de pico anódico
EPC	Electrodo de Pasta de Carbono
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EPCLI	Electrodo de pasta de carbono con líquido iónico

EPC- β CD	Electrodo de Pasta de Carbono Modificado con β -ciclodextrina
EPC-NPsAu	Electrodo de Pasta de Carbono Modificado con Nanopartículas de Oro
EPC-NPsAu• β CD	Electrodo de Pasta de Carbono Modificado con Nanopartículas de Oro Sintetizadas con β -ciclodextrina
EPt	Electrodo de Platino
EQE	Electroquímico-Químico-Electroquímico
ESnO	Electrodo de Óxido de Estaño
F	Constante de Faraday
Gr	Grafeno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Glu	Glutamato
HMT ⁻	Especie de melatonina monodesprotonada
H ₂ MT	Especie de melatonina totalmente protonada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución, siglas en inglés
HT	Histamina
i	Corriente
i_a	Corriente anódica
i_c	Corriente catódica
i_l	Corriente límite
i_p	Corriente de pico
i_{pa}	Corriente del pico anódico
$i_{pa(R)}$	Corriente del pico anódico sin β CD en el sistema
$i_{pa(R-\beta CD)}$	Corriente del pico del complejo de inclusión
i_{pc}	Corriente del pico catódico
I-L	Intervalo de linealidad
K_d	Constante de disociación
$K_{f1} = \log \beta_1$	Constante de formación
LD	Levodopa
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Sensibilidad
MEFC	Microelectrodo de fibras de carbono
MEB-T	Microscopía electrónica de barrido en modo de transmisión
MET	Metionina
MnHCF	Manganeso hexacianoferrato
MT	Melatonina
MT ²⁻	Especie de melatonina bidesprotonada

MT- β CD	Complejo de inclusión entre la melatonina y la β -ciclodextrina
n	Número de electrones
NAT	N-acetiltransferasa
NE	Noradrenalina o Norepinefrina
NPsAu	Nanopartículas de Oro
NPsAu• β CD	Nanopartículas de Oro Sintetizadas con β -ciclodextrina
NT	Neurotransmisores
NTCPM	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NTCPS	Nanotubos de carbono de pared simple
NVs-ZnO	Nanovarillas de óxido de zinc
OG	Óxido de grafeno
PEDOT	poly(3,4 Etilenodioxitiofeno)
pK_a	Constantes de acidez
PR	Piridoxina o vitamina B6
Q	Cargas
R	Constante de los gases ideales
R^2	Coefficiente de correlación
RPS	Resonancia de plasmón superficial
R_{sol}	Resistencia de la solución
R_{tc}	Resistencia de la transferencia de carga
SAH	Adenosil-homocisteína
SAM	Adenosilmetionina
SE	Sensores electroquímicos
SNC	Sistema nervioso central
SQUAD	Stability quotients from absorbance data
SR	Serotonina
T	Temperatura
t	Tiempo
Trp	Triptófano
μA	Unidades de Absorbancia
v	Velocidad de barrido del potencial
ν_c	Viscosidad cinemática
VC	Voltamperometría cíclica
VDP	Voltamperometría diferencial de pulso
VL-DR	Voltamperometría lineal de disco rotatorio
$W_{1/2}$	Amplitud de onda media
Z_{im}	Componente imaginaria de la Impedancia
Z_{re}	Componente real de la Impedancia

αCD	α -ciclodextrina
βCD	β -ciclodextrina
γCD	γ -ciclodextrina
ε	Coefficiente de absorptividad molar
ε_r	Constante dieléctrica
λ	Longitud de onda
σ	Desviación estándar
ν	Frecuencia
ω	Velocidad de rotación

I. Introducción

La melatonina, MT, es un neurotransmisor principalmente producido y secretado en la noche por la glándula pineal; regula el sueño y el ritmo circadiano (o reloj biológico), actúa como removedor de radicales libre y antioxidante, protege al sistema nervioso central y mejora la respuesta inmune[1,2], su deficiencia puede interferir principalmente con el sueño, lo cual se ve reflejado en niveles de estrés altos, ansiedad e incluso depresión, también puede ocasionar dolores de cabeza, así como enfermedades neurodegenerativas [3,4].

Debido a la importancia que tiene este neurotransmisor en el buen funcionamiento del organismo humano, se han realizado numerosos estudios en donde se proponen distintas técnicas para su cuantificación, tales como: fluorescencia [5], espectrofotometría UV-Vis [6], cromatografía de gases [7] y cromatografía de líquidos [3]. Sin embargo, estas técnicas requieren de equipos y consumibles costosos, la obtención de resultados demanda de un largo tiempo y además las muestras tienen que ser pretratadas, lo que retarda aún más el proceso, provocando un aumento en sus costos. En contraste, las técnicas electroquímicas ofrecen muchas ventajas sobre estos métodos, principalmente la rápida adquisición de datos, fácil manejo, bajos costos en relación al equipo empleado, y muchas veces las muestras no requieren de un pretratamiento, lo que simplifica, agiliza y minimiza sus costos. Entre las técnicas electroquímicas se encuentran las voltamperométricas, las cuales se basan en la utilización de electrodos de diferentes tipos, dependiendo de tipo de analito que se quiere determinar, es por ello que para su diseño se emplean distintos materiales metálicos y derivados del carbono. Sin embargo, la mayor problemática que muestran estos electrodos es la presencia de interferentes, es decir, algunas moléculas se oxidan a potenciales muy cercanos del analito de interés impidiendo su detección. En busca de mejorar la sensibilidad y selectividad de los electrodos, se modifica su superficie con ensambles supramoleculares y materiales nanoestructurados. Para la determinación de la MT, se han realizado pocos estudios, empleando principalmente electrodos contruidos con materiales costosos como el diamante [8,9], oro, platino, óxido de estaño [10], carbón vítreo [10–15], pasta de carbono con líquido iónico [16,17] y sólo en algunos trabajos se usan electrodos de pasta de carbono con aceite mineral que son más económicos [1,11,18–20]. La superficie de los electrodos

empleados se ha modificado con poli(fucsina ácida) [10], grafeno [21], nanotubos de carbono de pared simple [21] y múltiple [12,17,21], películas híbridas de poli(hexacianoferrato de manganeso) y poli(3,4-etilendioxitiofeno) [13], boro [8,9], nanopartículas de hidróxido de cobalto [17], nanovarillas de óxido de zinc [20] y óxido de grafeno decorado con nanopartículas de óxido de hierro [1], la principal problemática de estas modificaciones es que algunas son sumamente laboriosas y que se requiere modificar la superficie antes de cada determinación.

Una buena alternativa en la modificación de los electrodos es el empleo de la β -ciclodextrina, β CD, ya que posee dos importantes propiedades, la de formar complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas y la de electropolimerizar fácilmente sobre la superficie de algunos materiales, haciendo posible el aumento de la sensibilidad y selectividad de los electrodos hacia diversas especies de interés [22–26]. Por otro lado, las nanopartículas de oro, NPsAu, exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas intrínsecas a su tamaño nanométrico, por lo que al usarse en la modificación de los electrodos promueven la transferencia de electrones, aumenta la actividad electrocatalítica y por consiguiente mejora su sensibilidad y selectividad. Recientemente, las NPsAu se han sintetizado con β -CD [27], ofreciendo al campo de los sensores electroquímicos un nuevo material que conjunta las propiedades de ambos componentes y cuya preparación es sencilla.

Por todo esto, los objetivos de este trabajo es la determinación de la MT mediante electrodos construidos con pasta de carbono modificando con β CD y NPsAu sintetizadas con β CD; para lo cual es necesario realizar estudios fundamentales que permitan conocer el comportamiento químico y electroquímico de la MT, así como sus constantes de acidez, comprobar la formación del complejo de inclusión entre la MT y la β CD y sus procesos redox.

El desarrollo de este trabajo se presenta de la siguiente manera: el **Capítulo 1** explica los fundamentos teóricos de los neurotransmisores y de la MT, describe las generalidades de los electrodos, las características principales de la β CD, NPsAu, NPsAu sintetizadas con β CD y su aplicación en la modificación de los electrodos en busca de mejorar su sensibilidad y selectividad. El **Capítulo 2**, muestra los resultados de los estudios de estabilidad usando la técnica de espectrofotometría UV-Vis a diferentes valores de pH, el efecto de la luz y el

oxígeno sobre la estabilidad de la molécula; además del cálculo de las de las constantes de acidez usando la misma técnica y el programa computacional SQUAD. En el **Capítulo 3** se presentan, mediante las técnicas de espectrofotometría UV-Vis y voltamperometría cíclica, los cálculos para la obtención de la constante de formación del complejo de inclusión de la MT y la β CD. En el **Capítulo 4** se expone la metodología utilizada para la síntesis de las NPsAu y construcción de los distintos electrodos (sin modificar y modificados con NPsAu, β CD y NPsAu sintetizadas con β CD); mientras que en el **Capítulo 5** se muestra el cálculo de la capacitancia y el área electroactiva de los electrodos, además de la caracterización electroquímica de la polimerización de las NPsAu con β CD. El **Capítulo 6** describe el comportamiento electroquímico de la MT y muestra el cálculo del número de electrones y coeficiente de difusión usando un EPC. En el **Capítulo 7**, se reporta el comportamiento del proceso de oxidación de la MT sobre los distintos EPC modificados; el **Capítulo 8**, plantea nuevos métodos de cuantificación de la MT en muestras sintéticas, utilizando los distintos electrodos, mediante las técnicas de voltamperometría cíclica y diferencial de pulso. Finalmente el **Capítulo 9**, muestra el estudio electroquímico de la MT en presencia de la Levodopa, otro importante neurotransmisor que coexiste en el mismo medio.

1.1 Referencias

- [1] H. Bagheri, A. Afkhami, P. Hashemi, M. Ghanei, Simultaneous and sensitive determination of melatonin and dopamine with Fe₃O₄ nanoparticle-decorated reduced graphene oxide modified electrode, RSC Adv. 5 (2015) 21659–21669.
- [2] G. Chen, X. Ding, Z. Cao, J. Ye, Determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations for health-caring purposes by capillary electrophoresis with electrochemical detection, Anal. Chim. Acta. 408 (2000) 249–256.
- [3] T. Kocadağlı, C. Yılmaz, V. Gökmen, Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry., Food Chem. 153 (2014) 151–6.
- [4] T.-Y. Choi, J.E. Kwon, E.S. Durrance, S.-H. Jo, S.-Y. Choi, K.-T. Kim, Melatonin inhibits voltage-sensitive Ca²⁺ channel-mediated neurotransmitter release., Brain Res. 1557 (2014) 34–42.
- [5] M.-H. Lee, J.L. Thomas, Y.-L. Chen, C.-F. Lin, H.-H. Tsai, Y.-Z. Juang, et al., Optical sensing of urinary melatonin with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays., Biosens. Bioelectron. 47 (2013) 56–61.

- [6] H.H. Abdine, A.A. Gazy, M.H. Abdel-hay, Simultaneous determination of melatonin – pyridoxine combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 379–386.
- [7] L.J. Nu, J.A. Squella, J.C. Sturm, H. Baez, C. Camargo, Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 929–938.
- [8] A.T. Ball, B.A. Patel, Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients, *Electrochim. Acta.* 83 (2012) 196–201.
- [9] A. Levent, Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 21 (2012) 114–119.
- [10] S.-M. Chen, G.-H. Chuang, Electropolymerization of polymerized fuchsin acid films enhanced by Nafion® and their electrocatalytic properties with melatonin and 3,4-dihydroxyphenylalanine, *J. Electroanal. Chem.* 575 (2005) 125–137.
- [11] A. Radi, G. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.
- [12] W. Qu, F. Wang, S. Hu, D. Cui, Electrocatalytic properties and voltammetric determination of melatonin at a nanostructured film electrode, *Microchim. Acta.* 150 (2005) 109–114.
- [13] T. Tsung-Hsuan, H. Yun-Chin, C. Shen-Ming, Manganese Hexacyanoferrate with Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) Hybrid Film Modified Electrode for the Determination of Catechin and Melatonin., *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 3238–3253.
- [14] C.A. Caro, L. Lillo, F.J. Valenzuela, G. Cabello, E. Lang, D. Vallejos, et al., Oxidation of melatonin on a glassy carbon electrode modified with metallic glucosamines. Synthesis and characterization, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 993–1000.
- [15] J. Smajdor, R. Piech, M. Pięk, B. Paczosa-Bator, Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 278–284.
- [16] H. Zeinali, H. Bagheri, Z. Monsef-Khoshhesab, H. Khoshsafar, A. Hajian, Nanomolar simultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO₂-Co₃O₄@rGO nanocomposite, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 386–394.
- [17] A. Babaei, A.R. Taheri, I. Khani Farahani, Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 183 (2013) 265–272.
- [18] J.L. Corujo-Antuña, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 421–9.
- [19] J.L. Corujo-Antuña, S. Martínez-Montequín, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García,

- Sensitive adsorptive stripping voltammetric methodologies for the determination of melatonin in biological fluids, *Electroanalysis*. 15 (2003) 773–778.
- [20] E. Molaakbari, A. Mostafavi, H. Beitollahi, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine, *Sensors Actuators, B Chem.* 208 (2015) 195–203.
- [21] F.J.V. Gomez, A. Martín, M.F. Silva, A. Escarpa, Screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes or graphene for simultaneous determination of melatonin and serotonin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1925–1931.
- [22] A. Abbaspour, A. Noori, A cyclodextrin host-guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine., *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4674–80.
- [23] G. Alarcón-Angeles, B. Pérez-López, M. Palomar-Pardavé, M.T. Ramírez-Silva, S. Alegret, A. Merkoci, Enhanced host – guest electrochemical recognition of dopamine using cyclodextrin in the presence of carbon nanotubes, *Carbon N. Y.* 46 (2008) 898–906.
- [24] X. Wang, X. Li, C. Luo, M. Sun, L. Li, H. Duan, Ultrasensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on magnetism graphene oxide / β -cyclodextrin / Au nanoparticles composites for chrysoidine analysis, *Electrochim. Acta.* 130 (2014) 519–525.
- [25] D. Jia, J. Dai, H. Yuan, L. Lei, D. Xiao, Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using a gold nanoparticles-poly(luminol) hybrid film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode., *Talanta.* 85 (2011) 2344–51.
- [26] L. Tan, K.-G. Zhou, Y.-H. Zhang, H.-X. Wang, X.-D. Wang, Y.-F. Guo, et al., Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at β -cyclodextrin/graphene nanocomposite platform, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 557–560.
- [27] S. Pande, S.K. Ghosh, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Basu, S. Jana, et al., Synthesis of Normal and Inverted Gold - Silver Core - Shell Architectures in -Cyclodextrin and Their Applications in SERS, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 10806–10813.

II. Objetivos

II.1 Objetivo General

Construir un electrodo a base de carbono modificado con β -ciclodextrina y nanopartículas de oro sintetizadas con β -CD para la determinación cuantitativa de melatonina.

II.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar el comportamiento espectrofotométrico de la MT y obtener parámetros fisicoquímicos (pK_a) de la MT.
2. Sintetizar NPsAu por el método Turkevich [28].
3. Sintetizar NPsAu empleando β CD por el método Pande [27].
4. Estudiar la formación del complejo de inclusión de MT en la β CD.
5. Caracterizar electroquímicamente la MT con el EPC.
6. Caracterizar electroquímicamente la MT con el EPC modificado con nanopartículas de Au.
7. Caracterizar electroquímicamente la MT con el EPC modificado con el polímero β CD.
8. Caracterizar electroquímicamente la MT con el EPC modificado con NPsAu sintetizadas en presencia de β CD.
9. Optimizar las condiciones experimentales de las voltamperometrías: velocidad de barrido de potencial, intervalo de potencial de trabajo.
10. Obtener y evaluar el método analítico: intervalo dinámico de concentración de MT, LOD, LOQ, sensibilidad (m), concentración de interferentes.
11. Realizar la determinación de la MT en muestras sintéticas.

Capítulo 1. Melatonina y electrodos modificados

1.1 Importancia de la Melatonina

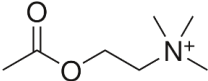
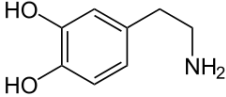
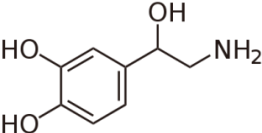
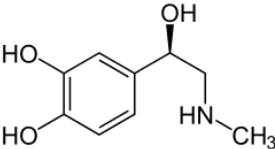
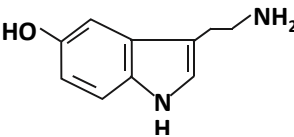
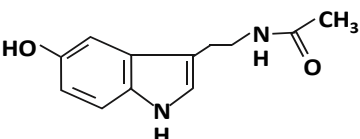
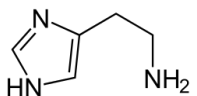
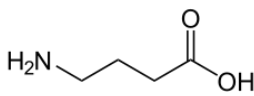
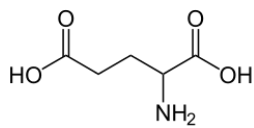
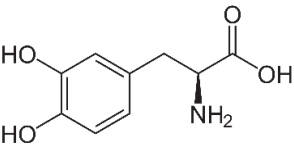
1.1.1 Neurotransmisores

Los neurotransmisores, NT, son sustancias químicas liberadas por las neuronas que permiten la comunicación dentro del sistema nervioso central, SNC, (cerebro, médula espinal, nervios y encéfalo) mediante impulsos eléctricos. Bajas concentraciones en el organismo, de algunos de ellos o de varios, pueden ocasionar padecimientos como depresión, dependencia de drogas, esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas, entre muchas otras [1,2].

La comunicación entre las neuronas es posible a partir de la sinapsis, la cual comienza con una descarga química-eléctrica en la membrana de una neurona transmisora, cuando este impulso nervioso llega al extremo del axón (extensa y fina prolongación neuronal), la neurona segrega un neurotransmisor que se aloja en el espacio sináptico entre las neuronas transmisora y receptora. Los neurotransmisores generan impulsos sensoriales y motores que estimulan o tranquilizan el cerebro y músculos [1,3].

A la fecha se han descubierto más de 40 NT, que se clasifican en dos grupos de acuerdo a su tamaño, en el primer grupo se encuentran las moléculas que tienen un tamaño pequeño, responsables de generar los impulsos que van hacia el cerebro y hacia los músculos. Mientras, que el segundo grupo está conformado por largas cadenas de neuropéptidos, que provocan cambios a largo plazo en la sinapsis. En la Tabla 1.1 se muestran algunos de los NT de moléculas pequeñas más estudiadas, su estructura molecular y principales funciones en el organismo humano. Los NT pequeños, se dividen de acuerdo a sus grupos funcionales: en Aminas que tienen un grupo amino ($-NH_2$); y en Aminoácidos que contienen ambos grupos $-NH_2$ y $-COOH$. Las aminas se subdividen en catecolaminas, indolaminas y Aminas Imidazol, según el compuesto unido a la $-NH_2$ [1,3]. Uno de los neurotransmisores esencial para que se lleven a cabo las conexiones neuronales es la acetilcolina, sin embargo, ésta no entra en ninguna de las clasificaciones, ya que es un éster compuesto de ácido acético y colina [4].

Tabla 1.1. Neurotransmisores de moléculas pequeñas más estudiados.

Neurotransmisor	Abreviatura	Estructura	Principal función
Acetilcolina	ACh		Permite la transmisión de los impulsos nerviosos en el SNC.
Aminas			
<i>Catecolamina</i>			
Dopamina	DA		Interviene en la regulación del control motor y de la memoria.
Noradrenalina o Norepinefrina	NE		Transmite mensajes a través del SNC, mediante de numerosos procesos fisiológicos.
Adrenalina o Epinefrina	EP		Está involucrada en el mecanismo central de control vasomotor y respiración.
<i>Indolaminas</i>			
Serotonina	SR		Regula el apetito mediante la saciedad, además controla las funciones perceptivas y cognitivas.
Melatonina	MT		Regula el sueño y el ritmo circadiano.
<i>Aminas Imidazol</i>			
Histamina	HT		Interviene en las secreciones hormonales y en las respuestas locales del sistema inmune.
Aminoácidos			
Ácido γ -aminobutírico	GABA		Reduce la excitabilidad neuronal a lo largo del SNC.
Glutamato	Glu		Primordial en la síntesis de distintos aminoácidos.
Levodopa	LD		Precursor metabólico de la DA, y la NE, etc. Medicamento más eficaz en el tratamiento del Parkinson.

Como puede observarse en la Tabla 1.1, dentro de las indolaminas se encuentra la melatonina, NT implicado en el sistema fisiológico que permite a los organismos vivir en armonía con la naturaleza de acuerdo a los ciclos del día, la noche y a las estaciones, por lo que es considerado como una neurohormona. La MT se sintetiza principalmente por los pinealocitos (células de la glándula pineal), a partir del aminoácido esencial triptófano, como se describe en la siguiente sección.

1.1.2 Síntesis de la Melatonina

La MT en la glándula pineal es sintetizada a partir del triptófano como un precursor que es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano y luego descarboxilado a serotonina. Este último es N-acetilado por la enzima N-acetiltransferasa, NAT, a N-acetilserotonina y finalmente convertido en MT por la enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (Figura 1.1). La noradrenalina, NE, también juega un papel importante en la síntesis de la MT, ya que ésta se inicia a partir de su liberación en las hendiduras sinápticas entre las terminaciones nerviosas y los pinealocitos. La NE se libera durante la noche y activa a la enzima adenil ciclasa, la cual induce a la producción del Adenosín monofosfato cíclico, AMPc, nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos. Éste a su vez, activa la NAT, la enzima clave de la síntesis de la MT. Algunos medicamentos como los β -bloqueadores, utilizados principalmente en el tratamiento de los trastornos del ritmo cardíaco y en la cardioprotección posterior a un infarto de miocardio, provocan la disminución de la secreción de la enzima NAT [5,6] y por lo tanto de la MT.

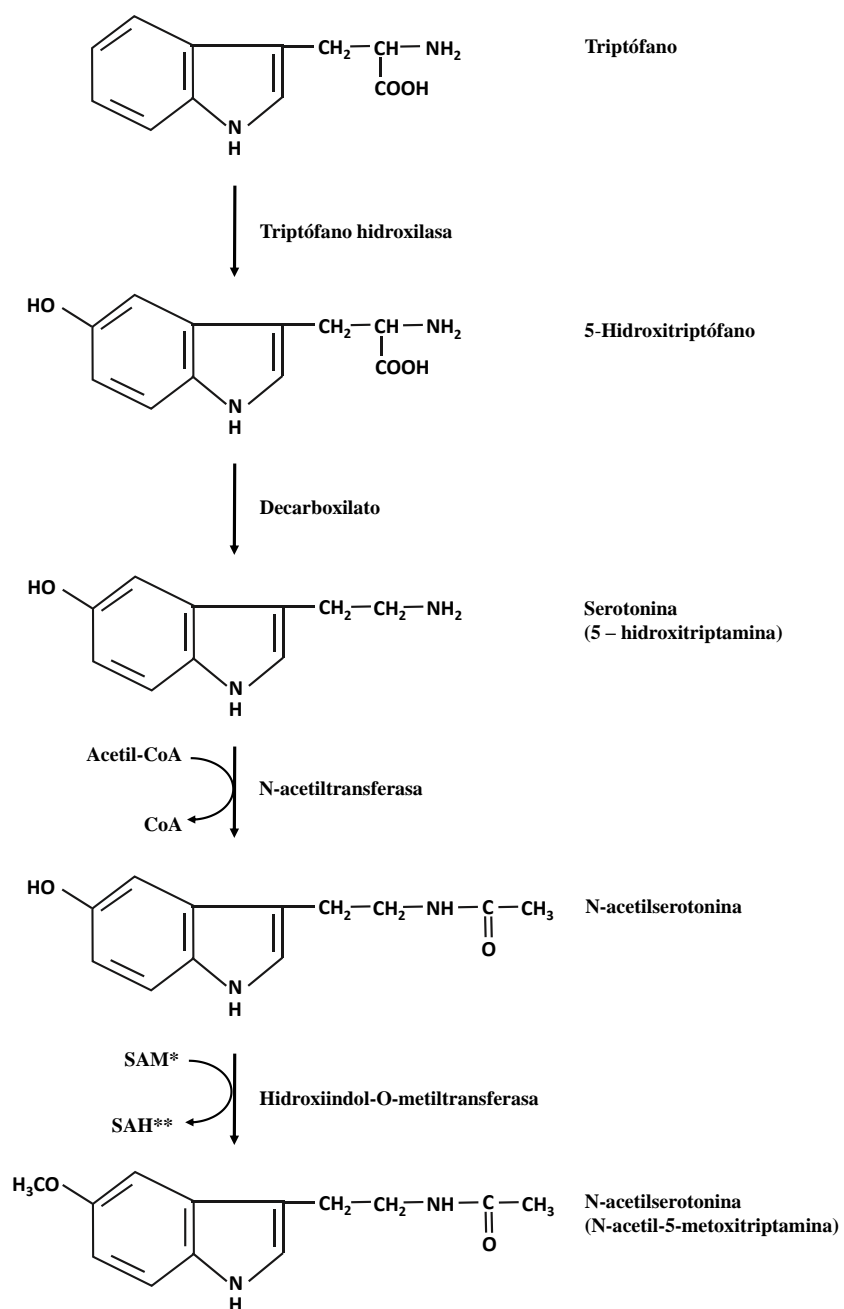


Figura 1.1. Esquema de la síntesis de melatonina que se lleva a cabo en la glándula pineal [6].

*S-adenosilmetionina

**S-adenosil-homocisteína.

1.1.3 Melatonina

La melatonina, MT (N-acetil-5-metoxitriptamina), Figura 1.2, es una neurohormona sintetizada hasta los 30 años de edad, principalmente en la glándula pineal, en las células de la retina, la médula ósea, el tracto gastrointestinal y la piel, entre otra gran variedad de células de distintos órganos; no se almacena en el organismo, sino que se difunde por la sangre y el fluido cerebroespinal [7,8]. No es una hormona exclusivamente animal, ya que se ha encontrado en más de 140 diferentes especies de plantas y alimentos, entre los que se encuentran la piña, frambuesa, tomate, avena, olivo y nueces [9].

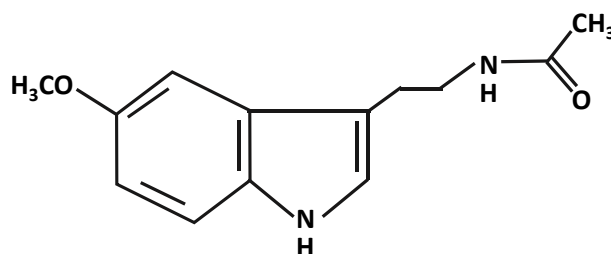


Figura 1.2. Estructura química de melatonina.

La MT regulariza el ritmo circadiano (o reloj biológico), permite conciliar el sueño y dormir bien, protege el SNC, mejora el funcionamiento del sistema inmunológico, es un removedor de radicales libres y un antioxidante muy efectivo por lo que repara el daño celular y retrasa el proceso de envejecimiento, también ayuda a reducir los efectos del estrés, así como también juega un papel determinante en la conducta y el peso corporal. Su deficiencia puede interferir con el sueño, lo cual se ve reflejado en niveles de estrés más altos, ansiedad, e incluso depresión, también puede ocasionar trastornos por déficit de atención con hiperactividad, bipolaridad, dolores de cabeza, incluida la migraña y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Esquizofrenia y Alzheimer [8,10–12].

1.1.3.1 Usos de la melatonina

En la actualidad la MT, se encuentra disponible en tabletas y cápsulas para el consumo humano en el alivio en trastorno del sueño y debido a su actividad antioxidante se encuentra disponible como un suplemento dietético en países como Canadá y EUA, en donde su venta

no requiere receta médica [7,13]. En México la Secretaría de Salud ha autorizado su comercialización únicamente como inductor de sueño, a la fecha son varias las industrias mexicanas que han obtenido su registro. Se usa principalmente en pacientes de edad avanzada que padecen insomnio, permitiéndoles conciliar el sueño y mejorar su calidad de vida; se emplea en el alivio del *jet-lag* (huso horario) provocado por largas horas de vuelo; además se emplea en el trastorno del sueño provocado por laborar en trabajos donde hay cambio de turnos [6,7,12,14]. Sin embargo, aún no se ha determinado el horario y la cantidad de dosificación más apropiada, la cual probablemente dependa tanto del desfase de horarios como de la distancia recorrida.

La MT también se ha probado en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades ocasionadas por el efecto de los radicales libres y de la acción oxidativa que se lleva a cabo en el organismo humano a lo largo de los años de vida, observando buenos resultados [6].

1.1.3.2 La melatonina como removedor de radicales libres y antioxidante

Los radicales libres son sustancias que se producen continuamente en las células como subproductos de la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos, procesos metabólicos claves en la producción del adenosín trifosfato el cual es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular. Los radicales libres en exceso pueden dañar diferentes componentes bioquímicos que constituyen a las células como el ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico), proteínas, carbohidratos y lípidos insaturados. Entre los radicales libres más agresivos se encuentran los radicales hidroxilo, radicales superóxido, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno molecular singlete. Algunas de las enfermedades que están relacionadas con los efectos que provocan los radicales libres son la aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide, catarata senil, trastornos neurodegenerativos (Parkinson y Alzheimer) y el cáncer [6].

Existen moléculas capaces de retardar o prevenir los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células, estas moléculas se conocen como antioxidantes e incluyen enzimas tales como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa; además de vitaminas entre las que se encuentra la E, C, A y su precursor caroteno; entre otras moléculas [6,15]. La MT es un antioxidante y removedor de radicales libres muy potente [12,13,15–

19], incluso más que la vitamina E, la cual se toma como referencia en los estudios relacionados con la producción y remoción de radicales libres [6,15–17]. La MT remueve directamente al radical hidroxilo y a otros radicales centrados en el oxígeno, inhibe a la enzima prooxidante óxido nítrico sintetasa y además incrementa los niveles de varias enzimas antioxidantes [6,15]. Debido a estas propiedades, se ha empleado en el tratamiento de algunas de las enfermedades provocadas por los radicales libres, obteniendo excelentes resultados terapéuticos como: en la prevención de la carcinogénesis [13,20], en la protección del daño cromosómico provocado por las radioterapia para el cáncer [17], en la protección del SNC y para mejorar el sistema inmunológico [6,12,16,20], en el tratamiento de varios estados patógenos como el Alzheimer y la neurotoxicidad inducida por glutamato [13,17], en el tratamiento de cefaleas recurrente [16], así como del antienvjecimiento [6,17]; sin embargo, los efectos de la administración a largo plazo aún no se han evaluado [6].

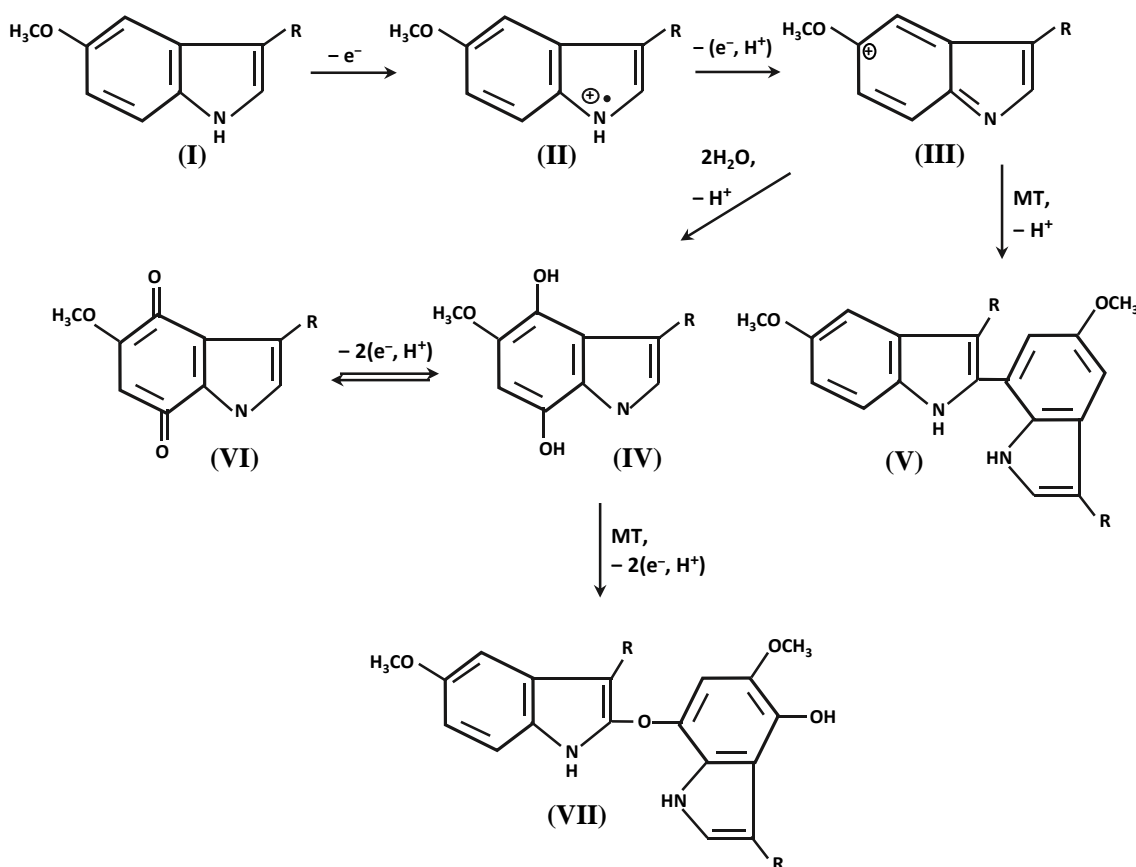
1.1.4 Técnicas utilizadas para su determinación

Debido a la importancia de la MT en el buen funcionamiento del organismo humano, se han realizado numerosos estudios en donde se proponen técnicas para su determinación; tales como: fluorescencia [21], espectrofotometría ultravioleta [22], cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas [23] y cromatografía de líquidos [10]. Sin embargo, la más empleada en los laboratorios de diagnósticos médicos y de control de calidad de la industria farmacéutica; es la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [24–26], en muestras de plasma, bilis, tejidos intestinales, hierbas, algunos alimentos y formulaciones farmacéuticas, en algunos casos esta técnica se acoplada a: cromatografía electrocinética micelar [27,28], ionización por electroaspersión [29], fluorescencia [30] y espectrofotometría de masas [10]. No obstante, estas técnicas requieren de equipos y consumibles costosos, además la obtención de resultados demanda de un largo tiempo de espera y las muestras tienen que ser pretratadas.

La relevancia de la MT dio pie al desarrollo del primer método electroquímico, reportado en 1998 por Radi *et al* [31], en donde se estudia la determinación cuantitativa en cápsulas de MT usando un electrodo de pasta de carbono, EPC, y un electrodo de carbono vítreo, ECV. Durante la investigación, observaron que la transferencia de masa es un proceso controlado por difusión y que su posible mecanismo de oxidación es en dos pasos, como se muestra en

la Figura 1.3, el primer proceso de oxidación I involucra la pérdida de un electrón ($-1e^-$) (I), lo que genera un radical catión (II); en el segundo proceso el radical catión se oxida por la pérdida de un segundo electrón y protón ($-1e^-$ y $-1H^+$) en una quinonaimina muy reactiva (III).

La quinonaimina es susceptible de un ataque nucleofílico en la posición 2 y 5, por lo que se lleva a cabo una reacción química, produciendo diferentes enlaces de dímeros carbono-carbono (V). Otra reacción química que puede ocurrir, es mediante un ataque por agua a la quinonaimina (III) produciendo el derivado indólico 4,5 dihidroxi (IV), el cual se oxida para dar una quinona muy estable (VI) o para formar el 2,5-dímero (VII) mediante el ataque del oxígeno desde la posición 2 de la MT, reportada como la más nucleofílica (Figura 1.3).



Esquema 1.3 Esquema del mecanismo de oxidación de la MT propuesto por Radi *et al.* [31], donde $R = CH_2CH_2NHCOCH_3$.

Este trabajo demuestra la complejidad del mecanismo redox de la MT, sin embargo, la necesidad de desarrollar métodos que permitan su detección en distintas muestras de una

forma rápida, fácil, sin la necesidad de pretratar las muestras y que contrarreste los métodos validados más costosos, ha llevado al desarrollo de diversos electrodos que puedan ser sensibles a esta molécula. En 2000 Che *et al.* determinaron simultáneamente MT y piridoxina, PR, mediante electroforesis capilar con voltamperometría cíclica [12]. En 2003 Corujo *et al.* emplearon un EPC para cuantificar MT en tabletas; para ello no fue necesario tratar previamente las muestras, ya que la matriz no causó interferencia con la oxidación de la MT [11]; tiempo después, probaron el EPC en muestras biológicas usando la técnica voltamperometría de redisolución anódica, con la cual obtuvieron mejores parámetros analíticos, aunque el tiempo de análisis fue mayor [32]. En 2005 Qu *et al.*, fueron los primeros en reportar el uso de un electrodo modificado para la detección de la MT en muestras sintéticas; el cual consistió de un ECV con nanotubos de carbono de pared múltiple, NTCMP [33]. En 2011 Tsung *et al.*, utilizaron un ECV modificado con una película híbrida de hexacianoferrato de manganeso, HCFMn, y poly(3,4-etilenodioxitiofeno), PEDOT para detectar MT en muestras sintéticas [34]. En 2012 Crespi, estudió la influencia de la MT en ratas que bebían etanol, empleando un microelectrodo de fibras de carbono en muestras analizadas *in vitro* e *in vivo*. Durante la determinación *in vivo*, además del pico de oxidación de la MT, detectaron picos de oxidación del ácido ascórbico AA, ácido dihidroxifenilacético metabolito de la dopamina, DOPAC, y ácido 5-hidroxiindolacético metabolito de la serotonina, A5-HIA, los cuales no causaron interferencia [8]. Ese mismo año Ball y Patel, usando un electrodo de diamante, ED, dopado con boro, determinaron MT en tabletas [7]; de igual forma utilizando un ED dopado con boro Levent, cuantificó MT en muestras farmacológicas y orina [35]. En 2013 Babaei *et al.*, prepararon un electrodo de pasta de carbono con líquido iónico (metilimidazolio hexafluorofosfato), EPCLI, modificado con NTCMP decorados con nanopartículas de hidróxido de cobalto, NPs-CoOH, para la determinación simultánea de MT y levodopa, LD. El método se aplicó exitosamente en muestras farmacéuticas y orina; encontrando AA, ácido fólico, AF, ácido úrico, AU, ácido glutámico, AG, e histidina, HT; los cuales no interfieren con la medición de la LD y de la MT [14]. Durante el 2015 Molaakbar *et al.*, utilizando un EPC modificado con nanovarillas de óxido de zinc, NVs-ZnO, lograron detectar simultáneamente MT, dopamina, DA, metionina, MET, cafeína, CF, en muestras de orina y suero de sangre [36]. Bagheri *et al.*, usando un EPC modificado con óxido de grafeno, OGr, decorado con nanopartículas de óxido

de hierro, NPs-Fe₃O₄, lograron determinar MT en tabletas, DA en inyecciones, así como MT y DA simultáneamente en muestras de orina y suero; además encontraron que la señal del AA y AU, no se sobrepone a la de la MT y DA [37]. Ese mismo año Gómez *et al.*, cuantificaron MT y SR simultáneamente en soluciones farmacológicas, empleando un electrodo serigrafiado de carbono, ESC, modificado con nanotubos de carbono de pared simple, NTCPS, de pared múltiple, NTCPM y grafeno, Gr [9]. En 2016 Caro *et al.*, trabajaron con ECV modificados con complejos de glucosamina con cobalto, CoGluA, hierro, FeGluA, y níquel, NiGluA; de los cuales el CoGluA presentó una mayor selectividad hacia la MT en presencia de Triptófano, Trp, sin embargo todos exhibieron una baja electroactividad y la interferencia del Trp a altas concentraciones [38]. También en 2016 Apetrei *et al.*, usaron un ESC modificado con Gr para la cuantificación de MT en tabletas; sin tener que utilizar alguna técnica de separación, ya que los excipientes no causaron interferencia [39]. Zeinali *et al.*, determinaron MT y Trp individual y simultáneamente en tabletas, orina y suero de sangre, para ello usaron un EPCLI modificado con óxido de grafeno reducido, OGrR, decorado con nanopartículas de óxido de estaño y óxido de cobalto, NPs-SnO₂-Co₃O₄ [40]. Finalmente este año 2017 Smajdor *et al.*, analizaron muestras farmacéuticas con un ECV modificado con nanopulvos de negro de carbono, NPVs-NC [41]. En resumen, la Tabla 1.2, muestra los trabajos realizados, las muestras en las que determinó la MT, los materiales utilizados para el diseño de los electrodos, los límites de cuantificación y determinación, así como la sensibilidad reportada.

A pesar de las numerosas ventajas que presentan los métodos electroquímicos sobre otras técnicas, algunos materiales empleados para la construcción y modificación de los electrodos suelen ser de alto costo; por ejemplo, el diamante, los nanotubos de carbono, el grafeno, los óxidos, entre otros. Adicionalmente, muchos de ellos requieren de modificar la superficie antes de cada determinación, dificultando y aumentando los costos del método.

Tabla 1.2. Estudios realizados para la determinación de MT utilizando técnicas voltamperométricas.

Año	Cuantificación de MT en muestras	Electrodo	Modificación	LOD / μM	LOQ / μM	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	Referencia
1998	Cápsulas	EPC y ECV	No se modificó	2.3	-----	-----	[31]
2000	Sintéticas	ECV	No se modificó	1.3	-----	-----	[12]
2003	Tabletas	EPC	No se modificó	0.05	-----	0.195	[11]
2003	Fluidos biológicos	EPC	No se modificó	0.008	0.036	0.409	[32]
2005	Sintéticas	ECV	NTCPM	0.02	-----	-----	[33]
2011	Sintéticas	ECV	Película híbrida de MnHCF y PEDOT	100	-----	0.343	[34]
2012	Ratas adictas al etanol	MEFC	No se modificó	-----	-----	-----	[8]
2012	Tabletas	ED	Dopado con B	10.33	37.88	0.025	[7]
2012	Sintéticas y orina	ED	Dopado con B	0.11	0.37	0.4367	[35]
2013	Tabletas y orina	EPCLI	NCPM con NPs-CoOH	0.004	-----	-----	[14]
2015	Sintéticas y fluidos biológicos	EPC	NVs-ZnO	-----	-----	-----	[36]
2015	Farmacológicas y fluidos biológicos	EPC	OGr con Nps-Fe ₃ O ₄	0.0084	-----	-----	[37]
2015	Sintéticas	ESC	NTCPS, NTCPM, Gr	1.1	-----	-----	[9]
2016	Sintéticas	ECV	CoGluA, FeGluA y NiGluA	0.215	-----	-----	[38]
2016	Tabletas	ESC	Gr	0.87	-----	0.0371	[39]
2016	Tabletas y fluidos biológicos	EPCLI	OGrR decorado con NPs- SnO ₂ -Co ₃ O ₄	0.0041	-----	-----	[40]
2017	Farmacológicas	ECV	NC	0.019	-----	-----	[41]

1.2 Electroodos modificados, β -ciclodextrina y Nanopartículas de Au

1.2.1 Electroodos

Un sensor químico es un dispositivo que puede usarse para la medición directa de un componente determinado en una muestra, conocido como analito; es capaz de responder continuamente y de manera reversible, sin modificar la muestra. Los sensores químicos consisten de un elemento transductor de reconocimiento químico, el cual interactúa con el analito y los cambios químicos resultantes de la interacción generan una señal primaria, la cual es transformada por el elemento transductor en una señal secundaria (señal eléctrica), proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica [42,43].

En la actualidad, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de sensores, ya que estos pueden aplicarse en diversos campos como: la higiene industrial, el control de procesos, el control de calidad, los diagnósticos clínicos, la calidad del agua y del aire, la seguridad, las alarmas de seguridad en las casas, los controles remotos. Estas aplicaciones resultan económicas y conllevan beneficios sociales [44]. Entre la gran variedad de sensores químicos se encuentran los sensores electroquímicos, SE, en los cuales se usa un electrodo como elemento de reconocimiento y transductor, es por ello que estos dispositivos ocupan una posición líder entre los sensores disponibles en el mercado de la instrumentación analítica.

Los electrodos, son dispositivos simples que no necesitan de equipos de medición sofisticados, su señal traducida es eléctrica, fácilmente procesables por métodos electroquímicos (Figura 1.6), son dispositivos fácilmente miniaturizables, lo que permite mediciones en pequeños volúmenes de muestras y en zonas de dimensiones reducidas y presentan un intervalo de respuesta más amplio que la mayoría de los sensores químicos basados en otros principios. Un electrodo tiene un costo muy bajo, especialmente si se producen en serie, pudiéndose comercializar como dispositivos desechables [42]. Los SE se dividen en potenciométricos y amperométricos, esta clasificación está en función de la detección de la señal que puede ser: un potencial y una corriente, generada de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito [44].

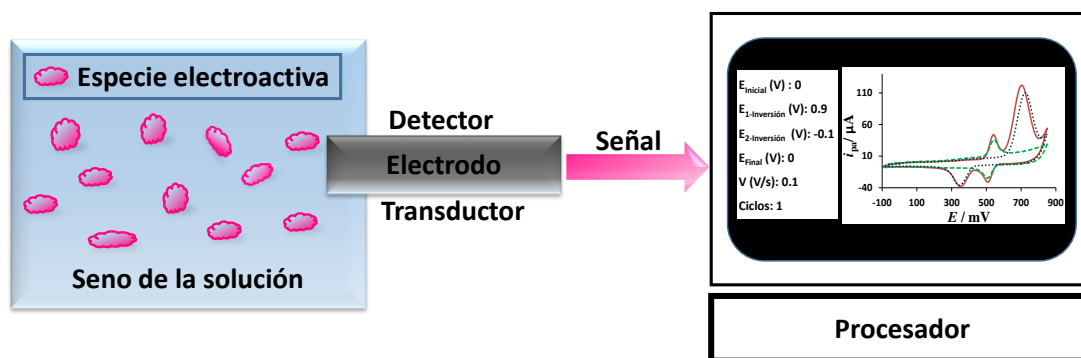


Figura 1.6. Esquema de la detección de la señal de un electrodo, generada a partir de las interacciones de la especie electroactiva con la superficie de éste.

Entre los SE que se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción del analito, especie electroactiva, se encuentran los sensores voltamperométricos; los cuales permiten la detección de la especie electroactiva de una manera rápida y sencilla. Para el diseño de los electrodos de trabajo se emplean materiales metálicos como oro, plata, platino y materiales derivados del carbono como diamante, carbón vítreo y pasta de carbono; con la finalidad de mejorar su sensibilidad y selectividad hacia la especie electroactiva, se modifica su superficie con materiales como: nanopartículas y nanovarillas de metales nobles, grafeno, nanotubo de carbono de pared simple y de pared múltiple, películas poliméricas, surfactantes y materiales nanocompuestos que combinan las propiedades de los componentes.

1.2.2 Electrodos de pasta de carbono

En particular, los electrodos de pasta de carbono, EPC, son usados como SE por su fácil preparación y bajos costos, además de que su superficie es fácilmente renovable y no presenta problemas al modificarse. El empleo de los EPC, ha dado buenos resultados en la cuantificación de distintos fármacos, como neurotransmisores. Algunos de los trabajos más citados, en donde se han desarrollados métodos voltamperométricos usando EPC para la determinación de neurotransmisores se citan a continuación: Corona *et al.* [45], determinaron la influencia del dodecilsulfato de sodio (SDS) en el comportamiento electroquímico de la DA usando un EPC, observaron que la constante de velocidad heterogénea (K^0) es

directamente proporcional a la concentración del SDS, que la oxidación de la DA se ve favorecida y que cuando la concentración del SDS es mayor a la concentración micelar crítica (CMC), la electrooxidación de la DA llega a ser un proceso controlado por la adsorción. Alarcón *et al.* [46], estudiaron el comportamiento electroquímico de la DA y AA usando un EPC con SDS a concentraciones aproximadas a la CMC, lograron separar los picos de oxidación de la DA y el AA, los cuales se traslapaban. Esto permitió la determinación selectiva de la DA, aun cuando el AA estaba presente. También Alarcón *et al.* [47], fabricaron un sensor de pasta de carbono modificado con β CD y NTCMP para la cuantificación de DA, obteniendo una excelente sensibilidad, selectividad y recobro [47]. En 2011 Corona *et al.* [48], consiguiendo separar las señales voltamperométricas de la DA y del AA en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), usando un EPC, con límites de detección de 11 μ M y de cuantificación de 37 μ M. En 2012 Colín *et al.* [49], realizaron un estudio electroquímico de la DA en presencia de AA y AU, usando un EPC modificado con 5 mM de SDS, observaron la separación de los tres picos de oxidación, así como un límite de detección de 3.70 μ M y de cuantificación de 12.05 μ M, lo que hizo posible la cuantificación de la DA en muestras farmacéuticas con un recobro de 95%. Una buena alternativa para mejorar la sensibilidad y selectividad del EPC es la β -ciclodextrina, β CD, ya que polimeriza fácilmente sobre su superficie, un ejemplo es el trabajo de Gil *et al.* [50], en el cual estudiaron el comportamiento electroquímico de la SR, logrando su determinación en presencia de DA y AA, con un EPC modificado con nanopartículas de oro sintetizadas con β -ciclodextrina, incrementado la intensidad de la respuesta electroquímica de la SR y mejorando aún más los parámetros analíticos. Un trabajo más reciente es el trabajo realizado por Montes *et al.* [51], en donde usando un EPC modificado con β CD y un electrodo serigrafiado modificado con β CD detectaron Histamina, HT, en ausencia y presencia de SR en muestras sintéticas. Esto demuestra que los EPC modificados con β CD han dado buenos resultados en la detección de estos neurotransmisores, en particular para aquellos que contienen grupos funcionales tales como aminas, como es el caso de la MT, por lo que esto daría una herramienta muy útil para mejorar su detección electroquímica.

1.2.3 β -ciclodextrina

Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos que se componen de macrociclos formados por unidades de D-glucopiranosas, tienen forma de un cono trunco con una cavidad interior

hidrofóbica y una exterior hidrofílica, por lo que pueden formar complejos de inclusión anfitrión-huésped mediante la inclusión de moléculas hidrofóbicas y ensamblajes supramoleculares con nanomateriales. En particular, la β -ciclodextrina, β CD, (Figura 1.7) es la ciclodextrina más estudiada, debido a que presenta un tamaño apropiado para interactuar con numerosas moléculas orgánicas [52], mejorando su solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y protegiéndolas del fenómeno de la oxidación responsable de los sabores y olores indeseables, así como de la contaminación microbiológica [53,54].

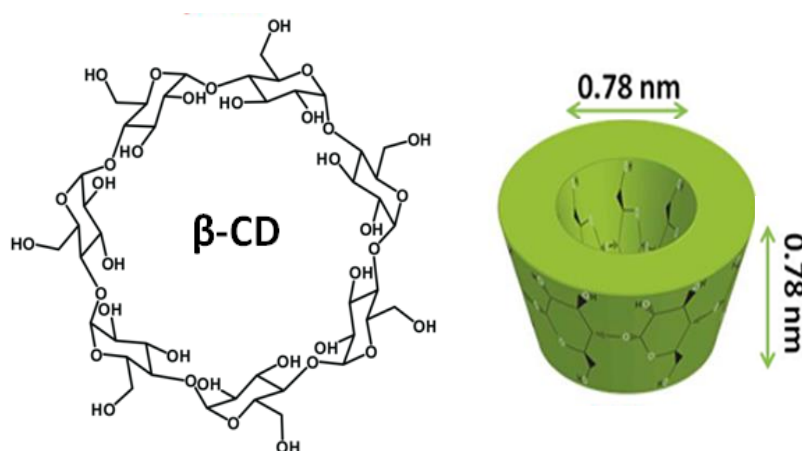


Figura 1.7. Estructura química de la β CD y dimensiones geométricas aproximadas [55].

Otra característica importante de la β CD, es su facilidad para electropolimerizar, ya que permite modificar la superficie de algunos SE como los EPC mejorando así su sensibilidad y selectividad [47,56–59]. De acuerdo con Roa *et al.* [60], su polimerización sobre un EPC se lleva a cabo de la siguiente forma: primeramente la adsorción de la β CD sobre la superficie del electrodo, podría estar ligada a las interacciones de los OH primarios de la β CD con la superficie del sustrato, la cual se favorece al aplicar ciclos de barrido de potencial sucesivos, donde se oxida la β CD y se generan radicales que se adhieren a la superficie del EPC (Figura 1.8). Entre tanto la formación del polímero, se debe a que los radicales formados durante la aplicación de potenciales de oxidación sucesivos, reaccionan con otras moléculas de β CD y forman dímeros con una subsecuente liberación de agua, los cuales a su vez reaccionan con

otras moléculas de β CD, para formar una película electroactiva, debido a la repetición del proceso durante n ciclos (Figura 1.9).

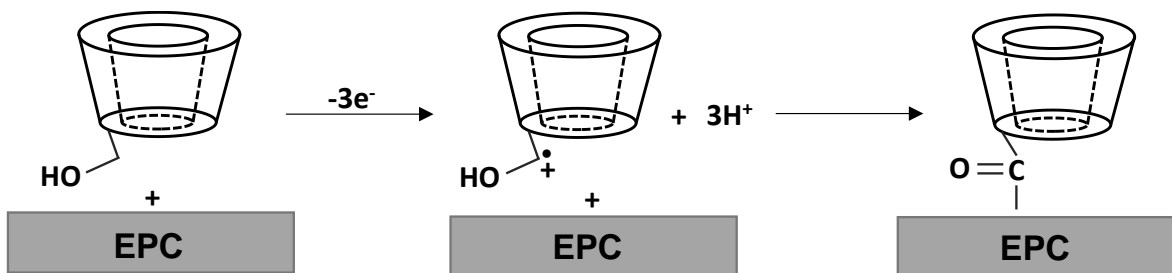


Figura 1.8. Esquema de la etapa inicial del mecanismo de modificación superficial del EPC con β CD [60].

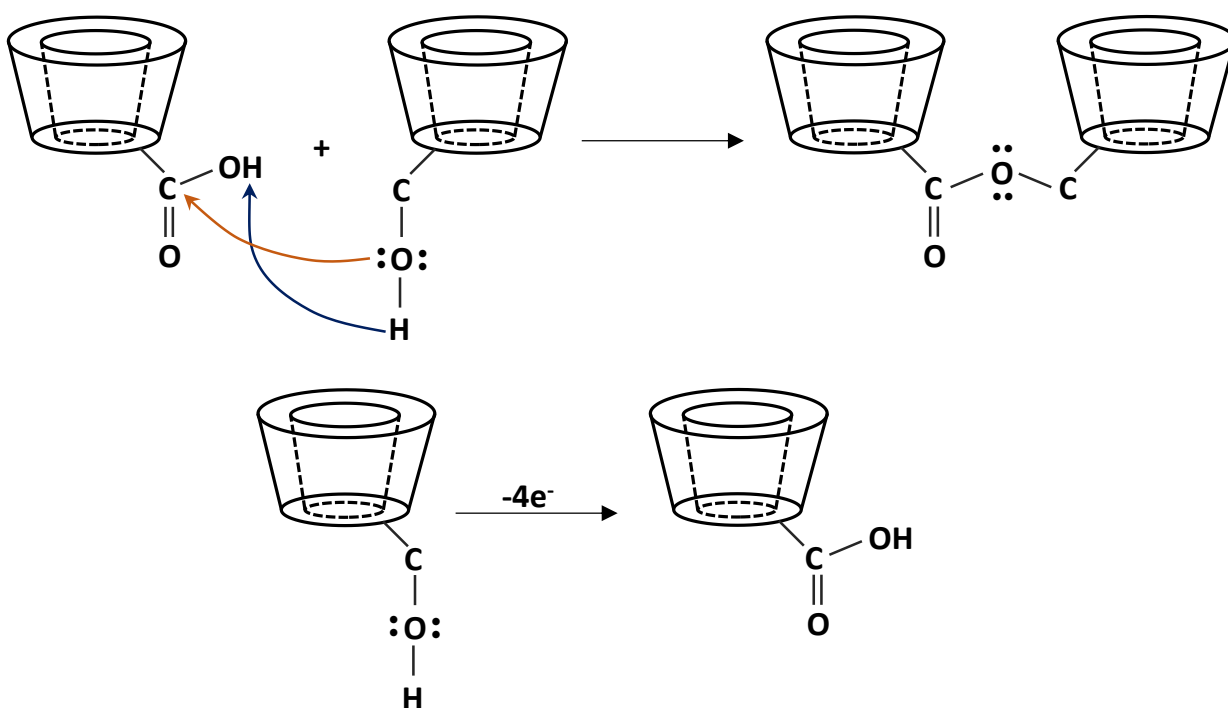


Figura 1.9. Esquema de la segunda etapa del mecanismo propuesto por Roa *et al.*, para la propagación del polímero de β CD sobre el EPC [60].

La β CD mejora las propiedades de los EPC, no solo porque forma complejos de inclusión con las especies electroactivas, sino también porque aumenta el área expuesta de los

electrodos, lo cual los hace una buena alternativa en la determinación de importantes sustancias como los neurotransmisores.

1.2.4 Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de oro, NPsAu, presentan excelentes propiedades eléctricas, magnéticas, ópticas, catalíticas y estructurales, inherentes a su tamaño nanométrico, lo cual permite tener un gran número de átomos superficiales y por lo tanto una energía superficial elevada. En los últimos años, la comunidad científica ha dedicado notables esfuerzos a la investigación y diseño de dispositivos nanoestructurados a partir de las NPsAu, para su aplicación en catálisis, biomedicina, farmacéutica, electrónica, química de alimentos y electroquímica, entre otros campos [61].

La utilización de las NPsAu se remonta a la antigüedad, existen evidencias que constatan el uso del oro en su estado coloidal en Egipto, China y Roma al rededor del siglo IV a. C. con fines decorativos, además de su empleo en China con fines terapéuticos. Durante la Edad Media el oro coloidal, se utilizó como elixir curativo de enfermedades venéreas, cardíacas, tumores y disentería. Sin embargo, el término “coloide” se introdujo por primera vez en 1861 por Thomas Graham, para describir los sistemas en donde el oro o plata en fase sólida se encontraban suspendidos en una fase líquida (agua) [61,62].

El método más utilizado en la preparación de NPsAu es el coloidal, ya que permite obtener partículas homogéneas de manera más reproducible; el método consiste en la reducción química de sales de oro en presencia de un agente estabilizador (Figura 1.10). A pesar que el oro coloidal es conocido desde la Antigüedad, no fue hasta 1857 que Faraday [63], publicó el primer estudio científico sobre coloides de oro, donde estudió sus propiedades ópticas. Un siglo después, en 1951 Turkevitch *et al.* [64], reportaron el método de preparación de coloides de oro, para la síntesis de partículas de oro de 20 nm por medio de la reducción con citrato de sodio, además explicando paso a paso el mecanismo de nucleación y crecimiento de las NPsAu. En 1973 Frenz *et al.* [65], sintetizaron NPsAu, usando como reductor citrato trisódico, lo que les permitió regular el tamaño de las partículas mediante la relación entre

el agente reductor y el agente estabilizante; razón por la cual en la actualidad es el método más utilizado para preparar nanopartículas metálicas.

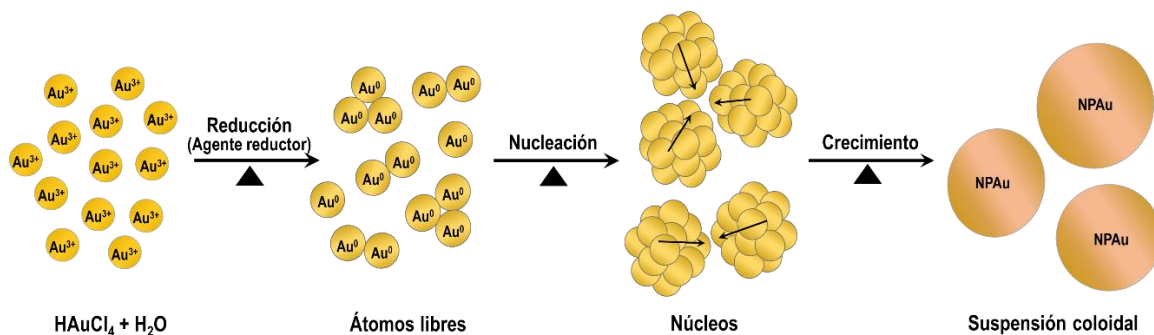


Figura 1.10. Esquema del mecanismo generalizado en tres pasos de formación de las NPAu sintetizadas por el método coloidal [66].

Dentro del campo de la electroquímica, las NPAu se han usado ampliamente en la modificar sensores electroquímicos, debido a que promueven la transferencia de electrones catalizando los procesos redox de la especie electroactiva. Además, de aumentar el área superficial, mejorar la sensibilidad y la selectividad de los electrodos; recientemente se han empleado en la detección de algunos neurotransmisores como la dopamina [67–70], serotonina [71], norepinefrina [68,72] y también en la detección simultánea de neurotransmisores como al dopamina y la serotonina [73], logrado su determinación en presencia de ácido ascórbico y ácido úrico; estos precedentes muestran que las NPAu son una opción viable para el desarrollo de electrodos modificados para la detección de distintas moléculas de interés biológico.

1.2.5 Nanopartículas de Oro con β -ciclodextrina

A partir de la reducción química de sales de oro, se obtienen dispersiones con aglomerados de átomos de oro inestables y que tienden a segregarse; lo que permite estabilizar al sistema mediante la formación de una doble capa de aniones alrededor de las NPAu. La doble capa genera una repulsión de tipo electrostática, contrarrestando las fuerzas de Van der Waals que

atraen entre sí a las partículas coloidales. Por años las dispersiones de NPsAu fueron estabilizadas por iones citrato, hasta que en 1994 Brust *et al.* [74], reportaron por primera vez la síntesis de NPsAu estabilizadas con dodecanotiol en solventes no polares, donde la reducción se realizó con diborano. Con este trabajo se demostró, que la estabilidad de las dispersiones coloidales no sólo se puede dar por efectos electrostáticos, sino también por impedimento estérico de macromoléculas adsorbidas en la superficie de las partículas coloidales.

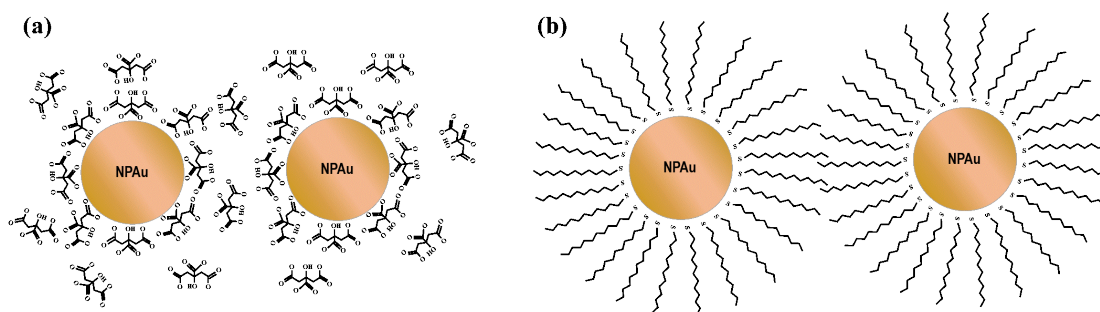


Figura 1.11. Representación esquemática, (a) de la estabilización electrostática de las NPsAu con iones citratos a partir de la metodología propuesta por Turkevitch *et al.* [64] y (b) estabilización estérica de las NPsAu por la adsorción de alcanotioles mediante la síntesis planteada por Brust *et al.* [74].

Los resultados obtenidos por Brust *et al.* [74], incentivaron las investigaciones de las partículas coloidales estabilizadas con diferentes macromoléculas como las ciclodextrinas, ofreciendo así un nuevo material que conjuntado ambas propiedades. Los trabajos realizados hasta el momento, en donde se usan ciclodextrinas en la síntesis de NPsAu para su estabilización, son los siguientes: en 1998 Liu *et al.* [75], describieron un método para preparar NPsAu con una capa de estabilización de alcanotioles y α -ciclodextrina, α CD. Los alcanotioles adsorbidos en la superficie de las partículas coloidales, tenían cadenas largas con un ferroceno como grupo terminal y formaban complejos de inclusión con la α CD, produciendo así rotaxanos. En 1999 Liu *et al.* [76], obtuvieron dispersiones de NPsAu con per-6-tio- β -ciclodexyrina, a las que posteriormente les adicionaron metanol de ferroceno o dímero de ferroceno, dando mejores resultados esta última. El per-6-tio- β -ciclodexyrina actúa como un receptor de las moléculas con ferroceno, dándole una mayor estabilidad estérica a la dispersión. En 2000 Lui *et al.* [77], prepararon NPsAu con ciclodextrinas

pertioladas (α , β o γ) mediante la reducción de $[\text{AuCl}_4]^-$ con NaBH en dimetilsulfóxido. En 2001 Lui *et al.* [78], sintetizaron NPsAu con α CD o β CD tioladas y derivados de ferroceno. En 2003 Lui *et al.* [79], discutieron la síntesis de las NPsAu mediante la reducción de ácido tetracloroáurico trihidratado por citrato sódico en presencia de β CD o γ CD, donde se observó que el tamaño de partícula depende del tipo y la concentración de CD, así como la cantidad de citrato. Finalmente en 2007 Pande *et al.* [80], reportaron por primera vez la síntesis de las NPsAu en presencia de β CD sin modificar, en donde la β CD actúa como agente reductor y estabilizador al emplearse directamente en la síntesis de nanopartículas, estabilizando electrostáticamente y estéricamente la dispersión.

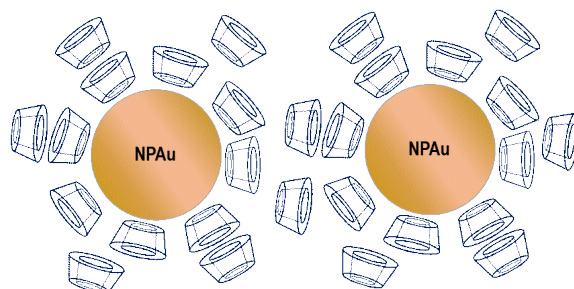


Figura 1.11. Representación esquemática de la estabilización electrostática y estérica de las NPsAu con β CD a partir del método propuesto por Pande *et al.* [80].

De esta forma se obtuvo un material novedoso para la modificación de los electrodos que ofrece la posibilidad de formar complejos de inclusión, así como catalizar las reacciones redox de las especies electroactivas. En este sentido, hasta ahora el único trabajo que se ha reportado es el de Gil *et al.*, en donde estudiaron el comportamiento electroquímico de la serotonina, SR, empleando un electrodo de pasta de carbono, EPC, modificado mediante la electropolimerización de nanopartículas de oro, NPsAu, sintetizadas con β CD. Reportando que, la actividad catalítica y la selectividad mejora hacia la SR en presencia de dopamina y ácido ascórbico [50].

1.3 Conclusiones

La síntesis de las NPsAu con β CD ofrece un nuevo material que promueve el flujo de electrones y por lo tanto cataliza las reacciones redox; por otro lado la β CD hace posible la formación de un complejo de inclusión con la MT, aumentando la sensibilidad y selectividad de los sensores electroquímicos hacia la MT. Aprovechando la facilidad que tiene la β CD para electropolimerizar sobre la superficie de electrodos de pasta de carbono, se propone realizar la detección de MT utilizando electrodos modificados con β CD y NPsAu con β CD; para alcanzar estos objetivos se realizan estudios previos de la estabilidad química, cálculo de los valores de las constante de acidez de la MT y el cálculo de la constante del complejo de inclusión. Además, se realizan estudios que permiten conocer el comportamiento electroquímico de la MT.

1.4 Referencias

- [1] J.E. Hall, Tratado de fisiología médica, Guyton y Hall, doceava edición, Booksmedicos.org, Elsevier, 2007.
- [2] M. Perry, Q. Li, R.T. Kennedy, Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters., *Anal. Chim. Acta.* 653 (2009) 1–22.
- [3] S.E. Hyman, Neurotransmitters, *Curr. Biol.* 15 (2005) R154–R158.
- [4] A. Velasco Martín, F.J. Alvarez González, Compendio de psiconeurofarmacología, Volumen1, Primera edición, Ediciones Díaz Santos, 1988, .
- [5] J. Szmuszkowicz, W.C. Anthony, R. V. Heinzelman, Synthesis of N-Acetyl-5-methoxytryptamin, *J. Org. Chem.* 25 (1960) 857–859.
- [6] F.A.M. Al-Omary, Melatonin. Comprehensive Profile, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, first edition, Elsevier Inc., 2013.
- [7] A.T. Ball, B.A. Patel, Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients, *Electrochim. Acta.* 83 (2012) 196–201.
- [8] F. Crespi, Influence of melatonin or its antagonism on alcohol consumption in ethanol drinking rats: a behavioral and in vivo voltammetric study, *Brain Res.* 1452 (2012) 39–46.
- [9] F.J.V. Gomez, A. Martín, M.F. Silva, A. Escarpa, Screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes or graphene for simultaneous determination of melatonin and serotonin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1925–1931.

- [10] T. Kocadağlı, C. Yılmaz, V. Gökmen, Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 153 (2014) 151–6.
- [11] J.L. Corujo-Antuña, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 421–9.
- [12] G. Chen, X. Ding, Z. Cao, J. Ye, Determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations for health-caring purposes by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Anal. Chim. Acta.* 408 (2000) 249–256.
- [13] M.L. Pola, M. Algarra, A. Becerra, M. Hernandez, Cyclodextrin Enhanced Spectrofluorimetric Determination of Melatonin in Pharmaceuticals and Urine, *Anal. Lett.* 33 (2000) 891–903.
- [14] A. Babaei, A.R. Taheri, I. Khani Farahani, Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 183 (2013) 265–272.
- [15] R. Hardeland, Antioxidative Protection by Melatonin, *Endocrine.* 27 (2005) 119–130.
- [16] V.D. Aher, A.K. Wahi, Melatonin: A Novel Biomaterial for Immunotherapy, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2 (2011) 772–777.
- [17] D. Bongiorno, L. Ceraulo, A. Mele, W. Panzeri, A. Selva, L.V. Turco, Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 743–754.
- [18] M. Karbownik, R.J. Reiter, J. Cabrera, J.J. Garcia, Comparison of the protective effect of melatonin with other antioxidants in the hamster kidney model of estradiol-induced DNA damage., *Mutat. Res.* 474 (2001) 87–92.
- [19] Vijayalaxmi, R.J. Reiter, M.L. Meltz, Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage., *Mutat. Res.* 346 (1995) 23–31.
- [20] H. Maeda, Y. Ogawa, H. Nakayama, Inclusion complexes of melatonin with modified cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 78 (2014) 217–224.
- [21] M.-H. Lee, J.L. Thomas, Y.-L. Chen, C.-F. Lin, H.-H. Tsai, Y.-Z. Juang, et al., Optical sensing of urinary melatonin with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays., *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 56–61.
- [22] H.H. Abdine, A.A. Gazy, M.H. Abdel-hay, Simultaneous determination of melatonin – pyridoxine combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 379–386.
- [23] L.J. Nu, J.A. Squella, J.C. Sturm, H. Baez, C. Camargo, Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 929–938.

- [24] T. Venkatachalam, K.G. Lalitha, Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Melatonin and Zolpidem from the Combined Tablet Dosage Form, *Int. J. Biol. Pharm. Res.* 5 (2014) 252–257.
- [25] S.P. Agarwal, H.J. Gonsalves, R.K. Khar, HPTLC Method for the Analysis of Melatonin in, *Asian J. Chem.* 20 (2008) 2531–2538.
- [26] H. Wang, Y.-W. Chung-Davidson, K. Li, A.M. Scott, W. Li, Quantification of monoamine neurotransmitters and melatonin in sea lamprey brain tissues by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry., *Talanta*. 89 (2012) 383–90.
- [27] D. Hevia, C. Botas, R.M. Sainz, I. Quiros, D. Blanco, D.X. Tan, et al., Development and validation of new methods for the determination of melatonin and its oxidative metabolites by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, using multivariate optimization., *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 1368–74.
- [28] T. Padumanonda, J. Johns, A. Sangkasat, S. Tiyaoranant, Determination of melatonin content in traditional Thai herbal remedies used as sleeping aids, *J. Pharm. Sci.* 22 (2014) 6.
- [29] M.D. Carter, M.W. Calcutt, B.A. Malow, K.L. Rose, D.L. Hachey, Quantitation of melatonin and n-acetylserotonin in human plasma by nanoflow LC-MS/MS and electrospray LC-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 277–285.
- [30] J.L.P. Muñoz, R.M. Ceinos, J.L. Soengas, J.M. Míguez, A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2173–7.
- [31] A. Radi, G.. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.
- [32] J.L. Corujo-Antuña, S. Martínez-Montequín, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Sensitive adsorptive stripping voltammetric methodologies for the determination of melatonin in biological fluids, *Electroanalysis*. 15 (2003) 773–778.
- [33] W. Qu, F. Wang, S. Hu, D. Cui, Electrocatalytic properties and voltammetric determination of melatonin at a nanostructured film electrode, *Microchim. Acta*. 150 (2005) 109–114.
- [34] T. Tsung-Hsuan, H. Yun-Chin, C. Shen-Ming, Manganese hexacyanoferrate with poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) hybrid film modified electrode for the determination of catechin and melatonin, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 3238–3253.
- [35] A. Levent, Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 21 (2012) 114–119.
- [36] E. Molaakbari, A. Mostafavi, H. Beitollahi, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine, *Sensors Actuators, B Chem.* 208 (2015) 195–203.

- [37] H. Bagheri, A. Afkhami, P. Hashemi, M. Ghanei, Simultaneous and sensitive determination of melatonin and dopamine with Fe₃O₄ nanoparticle-decorated reduced graphene oxide modified electrode, *RSC Adv.* 5 (2015) 21659–21669.
- [38] C.A. Caro, L. Lillo, F.J. Valenzuela, G. Cabello, E. Lang, D. Vallejos, C. Castillo, Oxidation of melatonin on a glassy carbon electrode modified with metallic glucosamines. Synthesis and characterization, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 993–1000.
- [39] I.M. Apetrei, C. Apetrei, Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 1859–1866.
- [40] H. Zeinali, H. Bagheri, Z. Monsef-Khoshhesab, H. Khoshsafar, A. Hajian, Nanomolar simultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO₂-Co₃O₄@rGO nanocomposite, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 386–394.
- [41] J. Smajdor, R. Piech, M. Pięk, B. Paczosa-Bator, Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 278–284.
- [42] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi, Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores : curso teórico-práctico, Univ. Autònoma de Barcelona, 2004.
- [43] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edition, John Wiley & Sons, 2006.
- [44] J.R. Stetter, W.R. Penrose, S. Yao, Sensors , Chemical Sensors , Electrochemical Sensors , and ECS, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) 11–16.
- [45] S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, M.T. Ramírez-Silva, G. Rosquete-Pina, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardave, On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution . Part I : The role of [SDS] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode, *J. Electroanal. Chem.* 609 (2007) 17–26.
- [46] G. Alarcón-Angeles, S. Corona-Avendaño, M. Palomar-Pardavé, A. Rojas-Hernández, M. Romero-Romo, M.T. Ramírez-Silva, Selective electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using sodium dodecyl sulfate micelles as masking agent, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 3013–3020.
- [47] G. Alarcón-Angeles, B. Pérez-López, M. Palomar-Pardavé, M.T. Ramírez-Silva, S. Alegret, A. Merkoçi, Enhanced host – guest electrochemical recognition of dopamine using cyclodextrin in the presence of carbon nanotubes, *Carbon N. Y.* 46 (2008) 898–906.
- [48] S. Corona-Avendaño, M.T. Ramírez-Silva, M. Palomar-Pardavé, L. Hernández-Martínez, M. Romero-Romo, G. Alarcón-Angeles, Influence of CTAB on the electrochemical behavior of dopamine and on its analytic determination in the presence of ascorbic acid, *J. Appl. Electrochem.* 40 (2010) 463–474.
- [49] E. Colín-Orozco, M.T. Ramírez-Silvia, S. Corona-Avendaño, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, *Electrochimica Acta* Electrochemical quantification of dopamine in

- the presence of ascorbic acid and uric acid using a simple carbon paste electrode modified with SDS micelles at pH 7, *Electrochim. Acta.* 85 (2012) 307–313.
- [50] Y. Gil-Orozco, Aplicación de nanopartículas de oro en la determinación de serotonina, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco, 2013.
- [51] R. Montes-Sánchez, Estudio Espectroelectroquímico de la Histamina, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco, 2016.
- [52] H. Sun, S. Zhao, F. Qu, Gold nanoparticles modified ceria nanoparticles for the oxidation of hydrazine with disposable screen-printed electrode, *Measurement.* 45 (2012) 1111–1113.
- [53] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, 329 (2007) 1–11.
- [54] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems., *Chem. Rev.* 98 (1998) 2045–2076.
- [55] J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743–1753.
- [56] A. Abbaspour, A. Noori, A cyclodextrin host-guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine., *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4674–80.
- [57] X. Wang, X. Li, C. Luo, M. Sun, L. Li, H. Duan, Ultrasensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on magnetism graphene oxide / β -cyclodextrin / Au nanoparticles composites for chrysoidine analysis, *Electrochim. Acta.* 130 (2014) 519–525.
- [58] D. Jia, J. Dai, H. Yuan, L. Lei, D. Xiao, Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using a gold nanoparticles-poly(luminol) hybrid film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode., *Talanta.* 85 (2011) 2344–51.
- [59] L. Tan, K.-G. Zhou, Y.-H. Zhang, H.-X. Wang, X.-D. Wang, Y.-F. Guo, et al., Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at β -cyclodextrin/graphene nanocomposite platform, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 557–560.
- [60] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.
- [61] L.M. Liz-Marz, Nanometals : Formation and color, *Mater. Today.* (2004) 26–31.
- [62] A. Roucoux, J. Schulz, H. Patin, Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts ?, *Chem. Rev.* 102 (2002) 3757–3778.
- [63] M. Faraday, The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philos. Trans. R. Soc. London.* 147 (1857) 145–181.

- [64] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 55 (1951) 55–75.
- [65] G. Frens, Z. Kolloid, J. Turkevich, J. Hillier, P.C. Stevenson, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22.
- [66] J. Polte, Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective, *RSC CrystEngComm.* 17 (2015) 6809–6830.
- [67] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, A. Saldaña-Botín, M.J. Arcos-Martínez, Determination of ascorbic acid in serum samples by screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles, *Talanta.* 174 (2017) 733–737.
- [68] F. Kurniawan, V. Tsakova, V.M. Mirsky, Analytical Applications of Electrodes Modified by Gold Nanoparticles: Dopamine Detection, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 2407–2412.
- [69] C.C. Tertis M, Florea A, Adumitrachioaie A, Cernat A, Bogdan D, Barbu-Tudoran L, Renault NJ, Sandulescu R, Detection of dopamine by a biomimetic electrochemical sensor based on polythioaniline bridged gold nanoparticles, *Chempluschem.* (2017) 1–47.
- [70] F.R. Caetano, L.B. Felipe, A.J.G. Zarbin, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application, *Sensors Actuators, B Chem.* 243 (2017) 43–50.
- [71] X. Wei, F. Wang, Y. Yin, Q. Liu, L. Zou, B. Ye, Selective detection of neurotransmitter serotonin by a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode, *Analyst.* 135 (2010) 2286.
- [72] T. Łuczak, Electroanalysis of Norepinephrine at Bare Gold Electrode Pure and Modified with Gold Nanoparticles and S-Functionalized Self-Assembled Layers in Aqueous Solution, *Electroanalysis.* (2009) 1539–1549.
- [73] R.N. Goyal, V.K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti, Gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode for the simultaneous determination of dopamine and serotonin: Application in pharmaceutical formulations and biological fluids, *Talanta.* 72 (2007) 976–983.
- [74] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 801–802.
- [75] J. Liu, R.L. Xu, a E. Kaifer, In situ modification of the surface of gold colloidal particles. Preparation of cyclodextrin-based rotaxanes supported on gold nanospheres, *Langmuir.* 14 (1998) 7337–7339.
- [76] J. Liu, S. Mendoza, E. Román, M.J. Lynn, R. Xu, A.E. Kaifer, Cyclodextrin-modified gold nanospheres. Host-guest interactions at work to control colloidal properties, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 4304–4305.

- [77] J. Liu, W. Ong, E. Román, M.J. Lynn, A.E. Kaifer, Cyclodextrin-modified gold nanospheres, *Langmuir*. 16 (2000) 3000–3002.
- [78] J. Liu, J. Alvarez, W. Ong, E. Román, A.E. Kaifer, Phase transfer of hydrophilic, cyclodextrin-modified gold nanoparticles to chloroform solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11148–11154.
- [79] Y. Liu, K.B. Male, P. Bouvrette, J.H.T. Luong, Control of the Size and Distribution of Gold Nanoparticles by Unmodified Cyclodextrins, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4172–4180.
- [80] S. Pande, S.K. Ghosh, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Basu, S. Jana, et al., Synthesis of Normal and Inverted Gold - Silver Core - Shell Architectures in α -Cyclodextrin and Their Applications in SERS, *J. Phys. Chem. C*. 111 (2007) 10806–10813.

Capítulo 2. Comportamiento espectrofotométrico de la melatonina

Conocer los valores de las constantes de acidez, pK_a , es muy importante para poder realizar cualquier estudio, ya que a partir del conocimiento de estos valores, es posible construir un diagrama de fracciones molares, los cuales brindan información del predominio de las especies en todo el intervalo del pH, de esta manera, se tendría el conocimiento de la especie con la que se está trabajando y su carga, lo cual permitiría determinar la manera en que la especie interacciona con los diferentes agentes, utilizados con el fin de mejorar la sensibilidad de los electrodo en su determinación.

La estructura química de MT, tiene dos grupos funcionales: indol y amida, los cuales pueden desprotonarse, por lo que al menos se esperarían dos valores de pK_a asociados a estos grupos. Hasta el momento, únicamente se han reportado dos investigaciones del cálculo de estos valores [1,2]. Mahal *et al.* [2], reportan solamente un valor de pK_a en 12.3, por otro lado He *et al.* [1], encontraron dos valores 1.2 y 12.7, ambos trabajos utilizaron la técnica de espectrometría de fluorescencia, no obstante, ninguno de los dos muestran las condiciones experimentales ni la metodología empleada; asociando los cambios de fluorescencia únicamente con el equilibrio ácido-base de la MT. Además, en el trabajo de He *et al.* [1], la reacción utilizada para ilustrar la desprotonación MT no cumplió con la primera ley de la termodinámica, es decir sus cargas no están balanceadas y el grupo funcional que reportan no corresponde al de la MT.

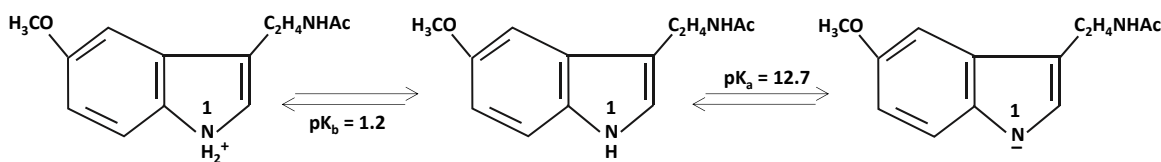


Figura 2.1. Esquema del equilibrio ácido-base de la MT propuesto por He *et al.* [1].

Por otro lado, en estos trabajos no se tomaron en cuenta los factores que pudieran afectar la estabilidad de la MT, provocando cambios en su comportamiento químicos. Es por ello, que en este trabajo se estudia la estabilidad de la MT a diferentes valores de pH, así como el

efecto de la luz y el oxígeno sobre su comportamiento espectral y en base a estos resultados, se calculan sus valores de pK_a , usando la técnica de espectrofotometría UV-Vis y el programa computacional SQUAD (Stability quotients from absorbance data) [3].

2.1 Metodología

2.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se preparan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad 18.2 M Ω cm, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con agua burbujeada con N₂. Durante los experimentos se mantiene una atmósfera inerte, evitando el contacto con el oxígeno; además se cubre el sistema protegiéndolo de la incidencia de la luz del ambiente. Los reactivos son los siguientes: MT (Sigma-Aldrich 98%), NaCl (J.T. Baker 99%), NaOH (J.T. Baker 98.4%), HCl (J.T. Baker 37%) y HClO₄ (Sigma-Aldrich 70%).

2.1.2 Instrumentación

El estudio del comportamiento espectrofotométrico de la MT, se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 30, en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico. Los espectros de absorción se obtienen en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm con una velocidad de 960 nmmin⁻¹ a temperatura ambiente. El pH se mide en un potenciómetro Seven Multi Mettler Toledo.

2.2 Resultados

2.2.1 Estudio espectrofotométrico en función del tiempo

2.2.1.1 Sin mantener una atmósfera de N₂ y sin proteger de la luz al sistema

En la Figura 2.2(a) se presentan los espectros de absorción de una solución 0.2 mM de MT obtenidos a diferentes tiempos de análisis durante 120 min, en un medio 0.1 M de NaCl, a pH 1; sin mantener una atmósfera de N₂ y sin proteger la solución de la luz. El espectro al tiempo cero (línea negra), muestra una banda de absorción cuyo máximo se ubica a una

longitud de onda, λ , de 278 nm, así como un hombro a 297 nm, al transcurrir el tiempo la absorbancia de la banda aumenta, esto se observa con mayor claridad en la Figura 2.2(b), donde se presenta la tendencia de la absorbancia a una longitud de onda de 278 nm en función del tiempo. Este comportamiento evidencia un cambio en la molécula producido por las interacciones con el ambiente, cambio que podría asociarse erróneamente a la variación relacionada con un equilibrio ácido-base de la MT, sobre todo en los casos donde el cálculo de los valores de pK_a se realizan por medio de titulaciones, la cuales requieren de al menos cuatro horas de análisis.

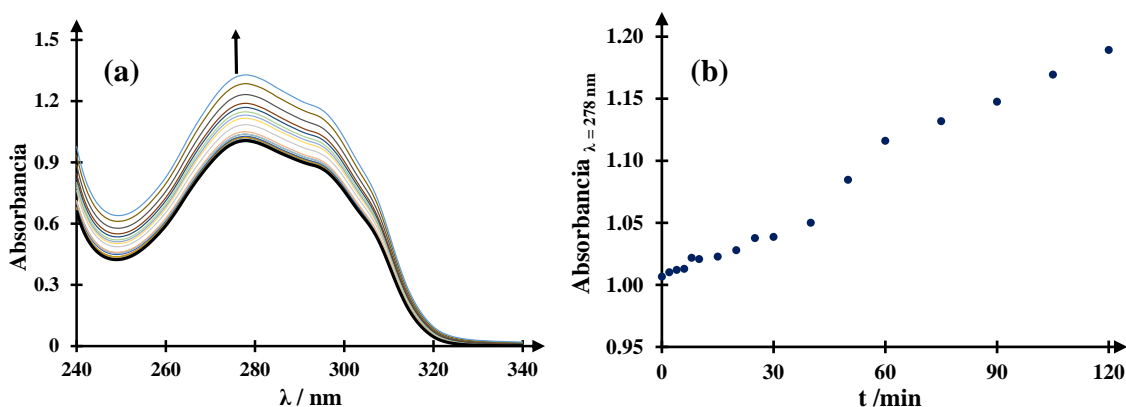


Figura 2.2. (a) Familia de espectros de absorción de la MT 0.2 mM en un medio acuoso 0.1 M de NaCl, a pH 1 obtenidos a diferentes tiempos de análisis durante 120 min, sin una atmósfera de N_2 y sin proteger el sistema de la luz. (b) Tendencia de la absorbancia a una λ de 278 nm en función del tiempo.

2.2.1.2 Manteniendo una atmósfera de N_2 y protegiendo de la luz al sistema

En contraste, en la Figura 2.3(a) se presenta los espectros absorción a diferentes tiempos obtenido a las mismas condiciones (pH 1), pero manteniendo el sistema bajo una atmósfera de nitrógeno y protegiéndolo de la luz. El espectro al tiempo cero muestran la banda y hombro de absorción característicos de la MT, cuya intensidad de absorbancia se mantiene estable durante todo el tiempo de análisis, esto puede verse claramente en la Figura 2.3(b), que muestra la absorbancia a 278nm en función del tiempo, en donde no se observan cambios.

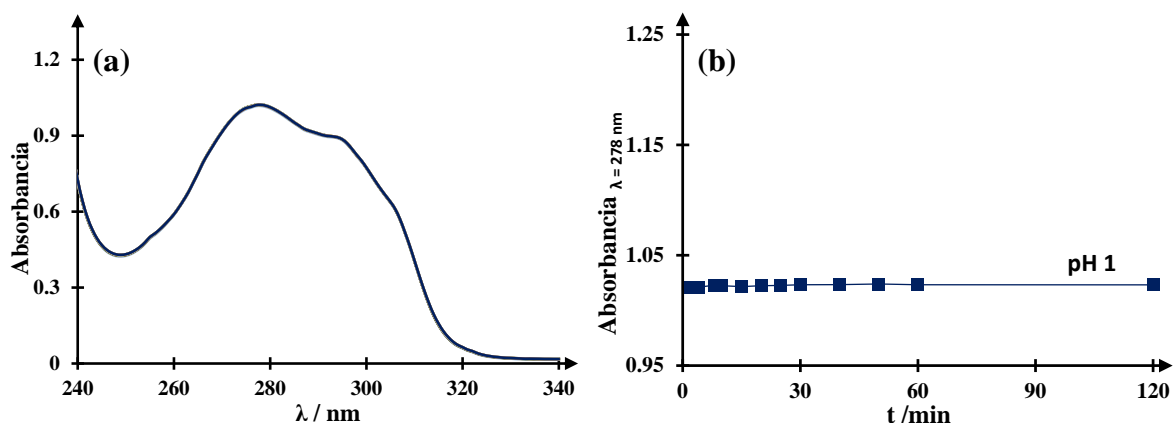


Figura 2.3. (a) Familia de espectros de absorción de la MT 0.2 mM en un medio acuoso 0.1 M de NaCl, a pH 1, a diferentes tiempos de análisis durante 120 min, manteniendo una atmósfera de N_2 y protegiendo el sistema de la luz. (b) Tendencia de la absorbancia a una λ de 278 nm en función del tiempo.

De igual forma y bajo estas mismas condiciones, se obtuvieron los espectros de absorción de la MT a pH: 3, 5 y 7 durante 120 minutos, los espectros de absorción correspondientes se muestran en la Figura 2.4(a), en donde se observa que la absorbancia de la banda y hombro característicos de la MT, se mantiene constante en el tiempo, lo cual es más claro en la Figura 2.4(b).

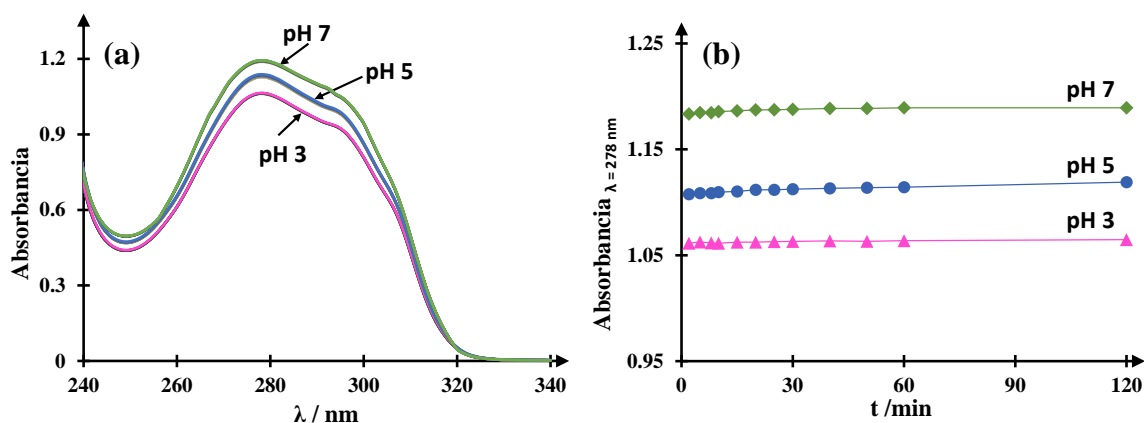


Figura 2.4. (a) Familia de espectros de absorción de la MT 0.2 mM en un medio de 0.1 M de NaCl, a distintos valores de pH, obtenidos a diferentes tiempos (120 min de análisis), manteniendo una atmósfera de N_2 y protegiéndola del contacto con la luz. (b) Tendencia de la absorbancia a una λ de 278 nm en función del tiempo a distintos valores de pH.

Estos estudios demuestran que la MT se ve afectada al interactuar con el oxígeno y la luz del ambiente, sin embargo al proteger el sistema se logra su estabilidad por al menos 120 minutos; haciendo posible la obtención de resultados confiables cuando se trabaja con valores de pH ácidos. Mahal *et al.* [2] y He *et al.* [1], no tomaron en cuenta estas consideraciones al realizar los experimentos, lo que podría haber influido en el valor del pK_a de 1.2 reportado por He *et al.* [1], el cual probablemente se deba a un cambio inducido por la degradación de la molécula al interactuar con luz y el oxígeno del ambiente, ya que estos factores influyen directamente en el cálculo de los valores de pK_a en ambos trabajos [1,2].

2.2.2 Determinación de las constantes de acidez

El cálculo del pK_a , se realiza a partir de una solución de MT, variando el pH y siguiendo los cambios a través de espectrofotometría UV-Vis, protegiendo a la molécula del contacto de la luz y del oxígeno durante todo el experimento, evitando así la descomposición de la MT. En la Figura 2.5(a) se presentan los espectros de absorción para la solución 0.2 mM de MT en 0.1 M de NaCl, a diferentes valores de pH en un intervalo de 0.5 a 12.5 obtenidos al hacer adiciones continuas de NaOH. Nuevamente, se observan las señales características de la MT, cuyo máximo de absorbancia está en 278 nm; la absorbancia muestra un incremento con el aumento del pH, el cual es más notable a valores por arriba de 4, ver Figura 2.5(b), esto puede asociarse con el predominio de especies desprotonadas, cuyo coeficiente de absorptividad es mayor.

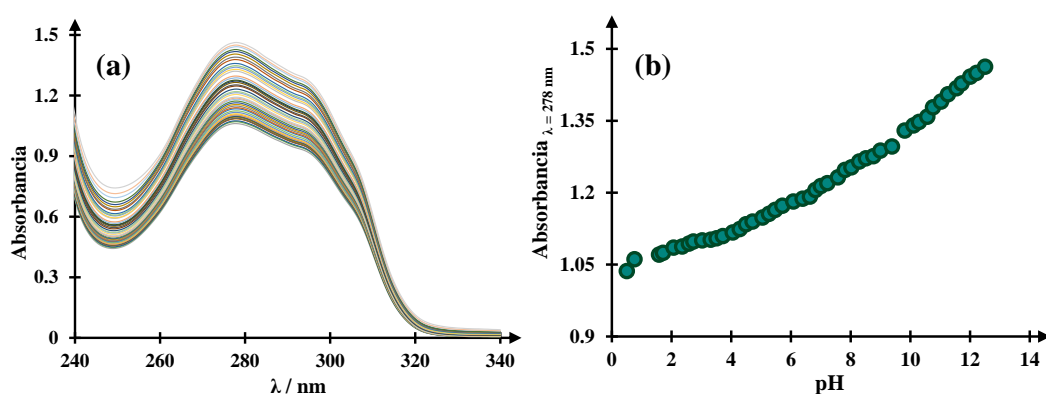


Figura 2.5. (a) Familia de espectros de absorción de una solución 0.2 mM de MT en un medio 0.1M de NaCl, a diferentes valores de pH, en un intervalo de 0.5 a 12.5, manteniendo una atmósfera de N_2 y protegiéndola del contacto con la luz. (b) Tendencia de la absorbancia a una λ de 278 nm como una función del tiempo.

Con el propósito de corroborar que la molécula de la MT no ha evolucionado en el tiempo durante la titulación, se hace una comparación entre los espectros de absorción obtenidos del estudio de estabilidad al tiempo cero a pH 1, 3, 5 y 7 (Figura 2.3(a) y 2.4(a)) y los de la titulación espectrofotométrica (Figura 2.5(a)), a los mismos valores de pH. La comparación se presenta en la Figura 2.6, en donde puede observarse que los espectros al tiempo cero (\circ) son similares a los obtenidos durante la titulación espectrofotométrica ($—$), esto comprueba que la molécula no se ha degradado durante el tiempo transcurrido en la titulación, por lo que los cambios espectrales son asociados solamente a los equilibrios ácido-base de la molécula.

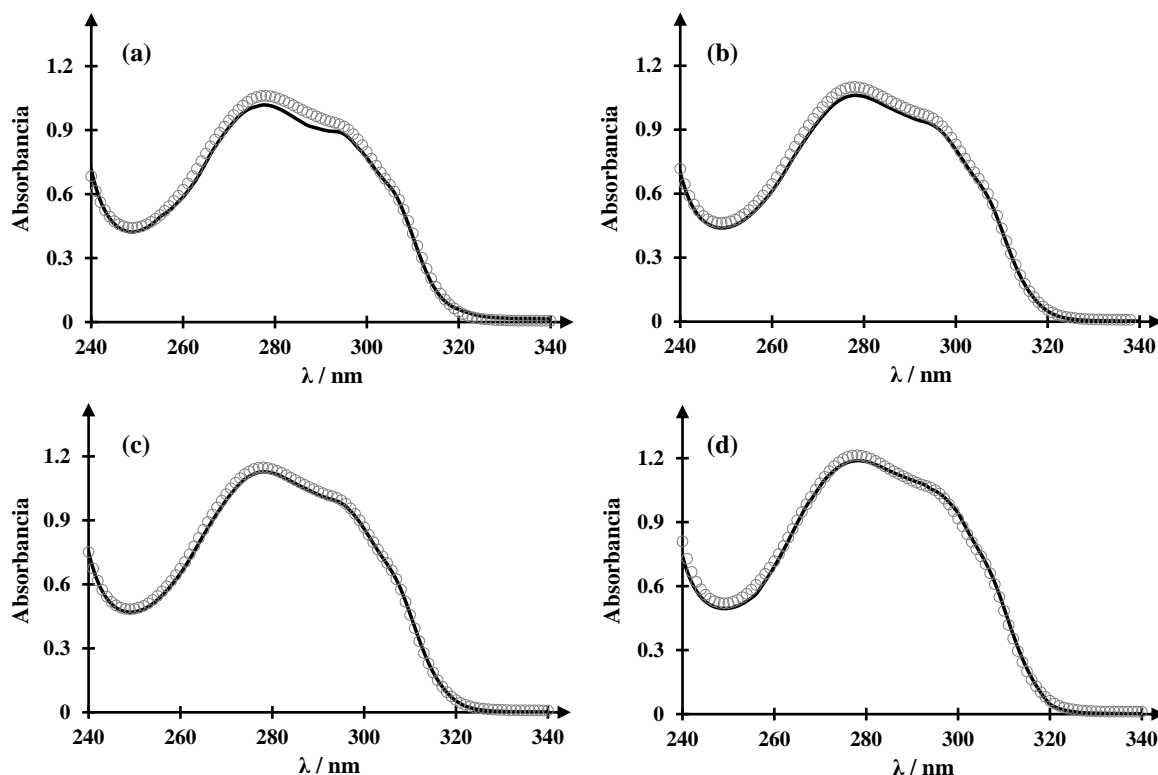


Figura 2.6. Comparación de los espectros de absorción de un sistema 0.2 mM de la MT en un medio de 0.1 M de NaCl, obtenidos al tiempo cero del estudio de estabilidad (\circ) y de la titulación ($—$), manteniendo una atmósfera de N_2 y protegiéndola del contacto con la luz, a valores de pH de: (a) 1, (b) 3, (c) 5 y (d) 7.

Para evaluar las constantes de acidez, se utiliza el programa computacional SQUAD [3], en el cual se introducen los datos de absorbancia en función del pH (Figura 2.5(a)) y un modelo

químico que considera los posibles equilibrios químicos, como lo reportaron Sánchez *et al.* [4]. El programa SQUAD computa los valores de las constantes de formación globales para los equilibrios propuestos, minimizando la suma de residuales al cuadrado entre los valores de las absorbancias obtenidas experimentalmente y los valores de absorbancia calculados por el programa [3,5,6], lo cual se explica con más detalle en el Anexo A. Para este caso se suministraron las absorbancias de 46 valores de pH dentro de intervalo de longitud de onda de 240 a 360 nm y el programa convergió para los siguientes valores de las constantes de formación globales de acidez $\log \beta_1 = 10.201 \pm 0.011$ y $\log \beta_2 = 15.974 \pm 0.02$, a partir de los cuales se obtuvieron los de pK_a que se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Constantes de acidez de la MT calculadas a partir de los datos de los espectros de absorción mostrados en la Figura 2.5(a) y del programa computacional SQUAD [3].

pK_{a1}	pK_{a2}
5.772 ± 0.011	10.201 ± 0.024
* $\sigma = 1.4741 \times 10^{-2}$, $U = 1.1302$, Datos = 5920	

Proteger el sistema de la luz y del oxígeno, permitió estimar con precisión las constantes de acidez de la MT en medio acuoso por primera vez, sin que estos factores influyeran en el cálculo, lo cual se refleja claramente en la discrepancia que existen con los reportados por Mahal *et al.* [2] y He *et al.* [1].

El programa SQUAD [3], proporciona los coeficientes de absortividad molar, ϵ , con su incertidumbre para cada una de las especies de la MT que predominan (H_2MT , HMT^- y MT^{2-}), estos valores son reportados en la Tabla 2.2; cabe resaltar que es el primer trabajo donde estos valores se reportan.

Tabla 2.2. Valores de algunos coeficientes de absortividad molar, ϵ , en función de la longitud de onda, λ , proporcionados por el programa SQUAD [3], para las especies H_2MT , HMT^- y MT^{2-} .

λ/nm	$\varepsilon_{H_2MT} / M^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\varepsilon_{HMT^-} / M^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\varepsilon_{MT^{2-}} / M^{-1}\text{cm}^{-1}$
240	3750 ± 28	4410 ± 33	5490 ± 42
245	2590 ± 22	3050 ± 26	3880 ± 33
250	2430 ± 22	2840 ± 25	3600 ± 32
255	2740 ± 20	3170 ± 23	3910 ± 30
260	3380 ± 19	3900 ± 23	4640 ± 29
265	4300 ± 22	4930 ± 26	5760 ± 33
270	5140 ± 25	5870 ± 30	6790 ± 38
275	5680 ± 27	6470 ± 32	7450 ± 41
280	5730 ± 28	6510 ± 32	7500 ± 41
285	5470 ± 27	6210 ± 31	7160 ± 40
290	5200 ± 26	5910 ± 30	6820 ± 38
295	4990 ± 25	5670 ± 29	6550 ± 37
300	4350 ± 22	4960 ± 26	5750 ± 33
305	3510 ± 18	4001 ± 21	4667 ± 28
310	2285 ± 13	2625 ± 16	3113 ± 20
315	920 ± 8	1090 ± 9	1370 ± 12
320	280 ± 5	350 ± 6	530 ± 7
325	90 ± 4	130 ± 4	260 ± 6
330	50 ± 3	80 ± 4	200 ± 5
335	40 ± 3	70 ± 4	180 ± 5
340	40 ± 3	70 ± 3	170 ± 4
345	40 ± 3	70 ± 3	160 ± 4
350	40 ± 2	70 ± 3	150 ± 3
355	30 ± 2	70 ± 3	140 ± 3
360	30 ± 2	60 ± 3	130 ± 3

Al graficar los ε de la Tabla 2.2 en función de la λ con las barras de error correspondientes, se obtiene el gráfico de la Figura 2.8, donde ε de las especies de la MT tienen la siguiente tendencia: $H_2MT < HMT^- < MT^{2-}$; mientras que apenas es posible apreciar las barras de error, lo que indica la existencia de tres especies distintas de MT.

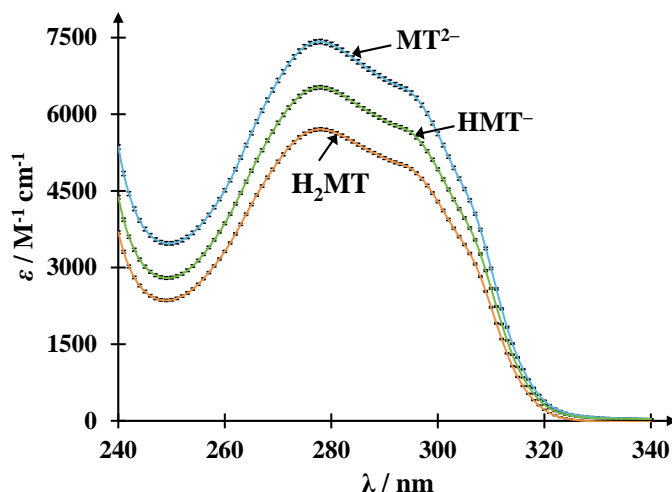


Figura 2.8. Coeficientes de absortividad molar en función de la λ generados por SQUAD [3], para las especies H_2MT , HMT^- y MT^{2-} .

A partir de los pK_a calculados, se construye un diagrama lineal del predominio de las especies siguiendo la metodología propuesta por Rojas *et al.* [7–9] (ver Figura 2.9), donde se observa que de pH de 0 a 5.772 ± 0.011 hay un predominio de la especie H_2MT , mientras que en el intervalo de 5.772 ± 0.011 a 10.201 ± 0.024 predomina de la especie el de HMT^- , finalmente de 10.201 ± 0.024 a 14 predomina la especie MT^{2-} .

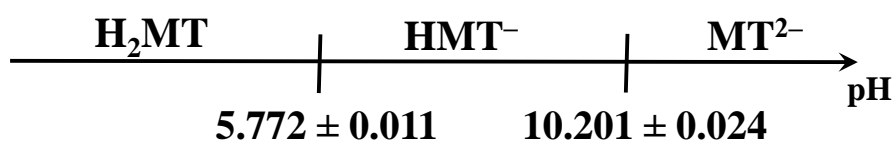


Figura 2.9. Diagrama de zonas de predominio lineal de las especies de la MT en función del pH, construido a partir de las constantes de acidez calculadas por SQUAD [3].

Con el objetivo de comprobar la precisión de las constantes de acidez calculadas, se compararon los espectros de absorción experimentales a diferentes valores de pH con los espectros teóricos, contruidos a partir de los valores de las constantes de formación ($\log \beta$) y de los coeficientes de absortividad de la Tabla 2.2, proporcionados por SQUAD, tal como

lo realizaron Palomar *et al.* [10]. La Figura 2.10, muestra que los espectros generados a partir de SQUAD (—) reproducen los espectros de absorción experimentales (\square), lo que indica que las constantes calculadas son confiables.

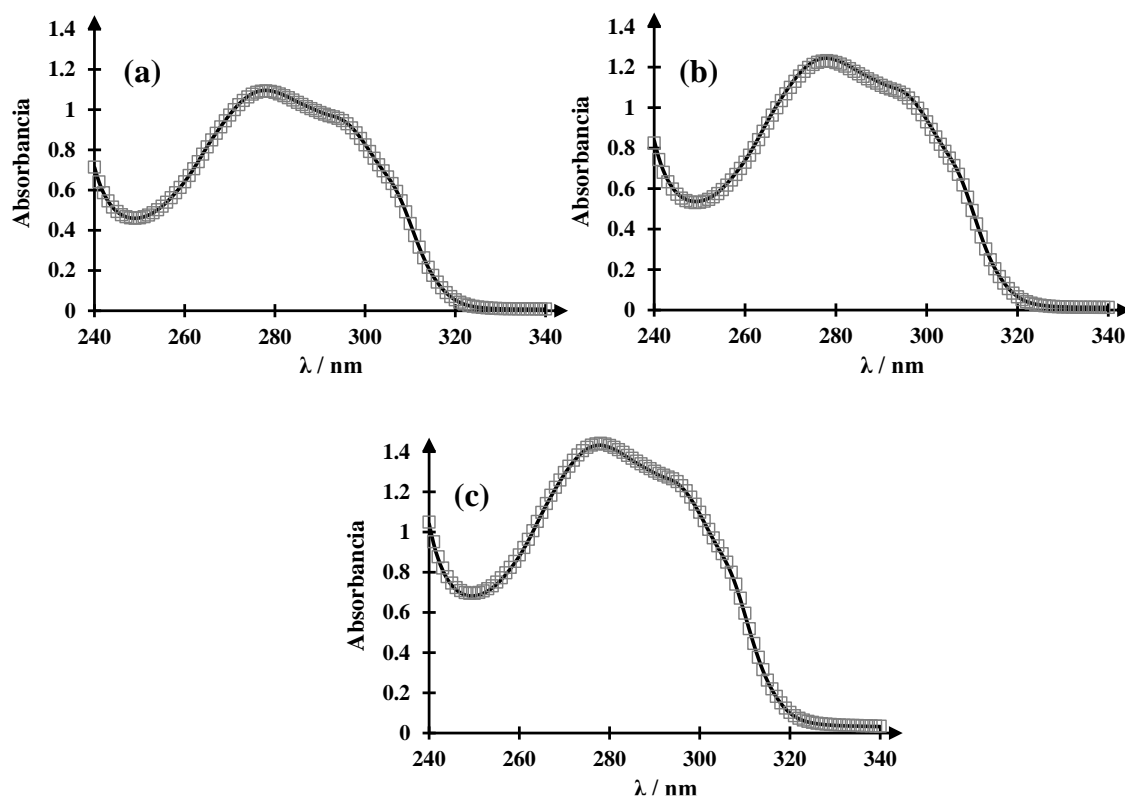


Figura 2.10. Comparación de los espectros de absorción experimentales (\square) y teóricos (—) a valores de pH de: a) 2.58, b) 7.57, y c) 12.01.

A partir de estos valores es posible plantear por primera vez el siguiente mecanismo de desprotonación de la MT, primeramente se propone un equilibrio que parte de la especie neutra debido a que para estos valores de pH no es posible que la especie tenga protones ácidos. En el primer equilibrio pK_{a1} la especie neutra se desprotona produciendo una especie cargada negativamente ($H_2MT \leftrightarrow HMT^- + H^+$), esta desprotonación puede darse en la amina del grupo indol; mientras que el valor de pK_{a2} se atribuye a una segunda desprotonación, posiblemente del grupo amida, en donde la especie cargada negativamente pierde un protón más, generando una especie con dos cargas negativas ($HMT^- \leftrightarrow MT^{2-} + H^+$). Este mecanismo propuesto se muestra en la Figura 2.7.

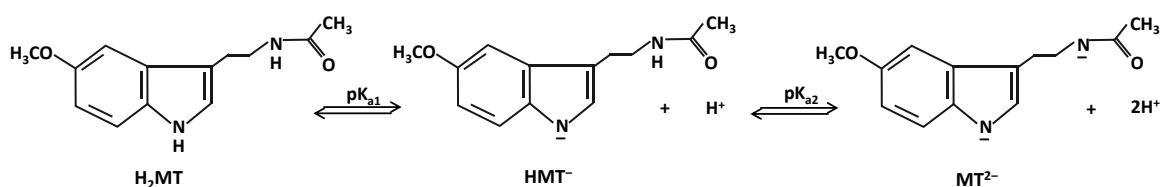


Figura 2.7. Mecanismo de desprotonación de la MT propuesto.

2.2.3 Variación de la concentración de la especie de la MT mediante espectrofotometría

El pH normal de los fluidos estomacales se encuentra entre 1.5 a 3.5, conocer el comportamiento de la especie que predomina en este intervalo, podría ayudar a entender las interacciones que se llevan a cabo en el tracto intestinal al ingerir pastillas de MT. Por esta razón se hizo un estudio espectrofotométrico variando la concentración de la MT a pH 3, en donde se tiene el predominio de la especie H_2MT , de acuerdo con el diagrama lineal del predominio de las especies de la Figura 2.9. En la Figura 2.11, se muestra la familia de espectros de la H_2MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0.01 a 0.37 mM, a pH 3. Los espectros de absorción típicos de la H_2MT incrementan su señal al aumentar la concentración de MT en el sistema.

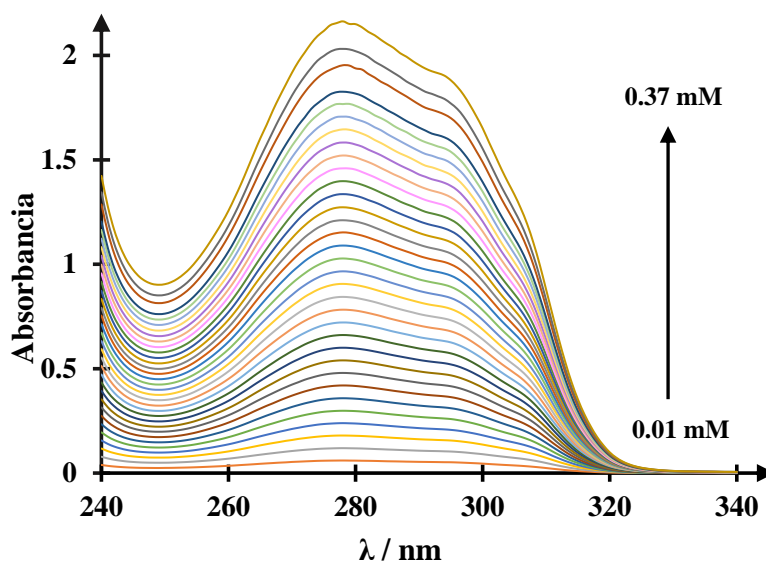


Figura 2.11. Espectros de absorción de la especie H_2MT de 0 a 0.37 mM en un medio 0.1 M de NaCl, a pH 3.

La Figura 2.12 muestra la tendencia de la absorbancia, A_b , de la H_2MT a una λ de 278 nm en función de su concentración a pH 3, obtenida de los espectros de absorción de la Figura 2.11. En ésta se observa una relación lineal entre la A_b y la concentración de la H_2MT , la expresión matemática que describe este comportamiento es:

$$A_b(uA) = (6.522 \pm 0.020)(uA \text{ mM}^{-1})[MT] - (0.031 \pm 0.004)(uA) \quad (2.1)$$

en donde el coeficiente de correlación, R^2 , es 0.999. Este comportamiento indica que para este sistema a pH 3 se cumple la ley de Lambert y Beer, en la cual la Absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito, matemáticamente se escribe como sigue

$$A_b = \epsilon bc \quad (2.2)$$

donde A_b es la absorbancia, ϵ el coeficiente de absortividad molar y b la longitud de paso óptico de la celda, que para este caso vale 1.

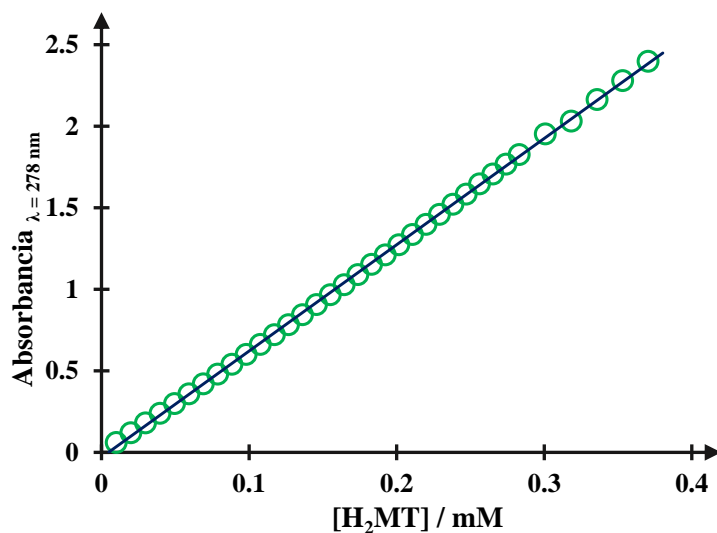


Figura 2.12. Tendencia de la Absorbancia a 278 nm de la H_2MT en función de su concentración a pH 3, obtenida de la Figura 2.11. La línea continua muestra el ajuste lineal de los datos experimentales.

La gráfica de la Figura 2.12, se conoce como curva de calibración, ya que permite conocer la concentración de la H_2MT en diferentes muestras a pH 3, donde se tiene un límite de detección $LOD = 5 \mu M$ y de cuantificación $LOQ = 18 \mu M$, así como una sensibilidad $m = 6.521 \text{ AmM}^{-1}$ y un intervalo de linealidad, I-L, de 10 a 370 μM . Con el fin de conocer si la ley de Lambert y Beer se cumple para las especies HMT^- y MT^{2-} , también se realizaron estudios de variación de concentración a pH 7 y pH 11. Los resultados de la sensibilidad, límite de cuantificación y detección se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Datos de obtenido de las curvas de calibración a una λ de 278 nm.

pH	Ecuación	m / $A \text{ mM}^{-1}$	LOD* / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
3	$A_b = 6.521[H_2MT] - 0.031$	6.521	5	18	10-370
7	$A_b = 6.682[HMT^-] - 0.042$	6.682	7	24	10-370
10	$A_b = 6.176[MT^{2-}] - 0.027$	6.176	8	25	10-370

*LOD: $3\sigma+b$

**LOQ: $10\sigma+b$

2.3 Conclusiones

A partir de los estudios de estabilidad espectrofotométricos se demostró que las condiciones ambientales afectan el comportamiento de la MT, sobre todo a valores de pH ácido, y que al proteger la molécula del oxígeno y de la luz se logra su estabilidad por un tiempo de al menos 120 minutos. Considerar la influencia de esto factores en la respuesta espectral de la MT, permitió calcular sus constantes de acidez de manera más exacta, reportando así por primera vez los valores de 5.772 ± 0.011 y 10.201 ± 0.024 en medios acuosos, además esto permitió obtener un método confiable para la cuantificación de la MT.

2.4 Referencias

- [1] H. He, M. Lin, Z. Han, Y. Muroya, H. Kudo, Y. Katsumura, The formation and properties of the melatonin radical: a photolysis study of melatonin with 248 nm laser light., *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 1568–1574.
- [2] H.S. Mahal, H.S. Sharma, T. Mukherjee, Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 557–565.
- [3] D.J. Legget, Computational methods for the determination of formation constants, Plenum press, New York, 1995.
- [4] A.E. Sánchez-Rivera, S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, M.A. Romero-Romo, Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 59 (2003) 3193–3203.
- [5] Balderas-Hernández, Patricia, Estudio de especiación de indicadores ácido-base de la familia de las sulfonftaleínas, en medio acuoso, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 2004.
- [6] A. Sierra-Zenteno, Determinación de las constantes de acidez del 2-(aminometil)bencimidazol por RMN de C 13, espectrofotometría y potenciometría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2002.
- [7] A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez, J.G. Ibáñez, I. González, Construction of multicomponent Pourbaix diagrams using generalized species, *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 365–371.
- [8] A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez, I. González, Equilibria among condensed phases and a multi-component solution using the concept of generalized species. Part II. Systems with polynuclear species, *Anal. Chim. Acta.* 278 (1993) 335–347.
- [9] A. Rojas, I. González, Relationship of two-dimensional predominance-zone diagrams with conditional constants for complexation equilibria, *Anal. Chim. Acta.* 187 (1986) 279–285.
- [10] M. Palomar-Pardavé, G. Alarcón-Ángeles, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, A. Rojas-Hernández, S. Corona-Avendaño, Electrochemical and spectrophotometric determination of the formation constants of the ascorbic acid- β -cyclodextrin and dopamine- β -cyclodextrin inclusion complexes, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 69 (2011) 91–99.

Capítulo 3. Determinación de la constante de formación del complejo de Inclusión de la melatonina y la β -ciclodextrina

La MT tiene la desventaja de ser poco soluble en agua, sin embargo, la formación de complejos de inclusión anfitrión-huésped con ciclodextrinas permite incrementar su solubilidad [1,2]; en particular la β -ciclodextrina es el agente complejante más utilizado debido a su disponibilidad a bajo costo [3,4]. En este sentido, se ha estimado la constante de formación del complejo de inclusión, $\log K$, entre la MT y la β CD, MT- β CD (Figura 3,1), mediante espectrofotometría de fluorescencia en una mezcla etanol: agua (1:1) [4,5] y agua [3,6]. Sin embargo, como se demostró en el capítulo 2, la MT es inestable cuando la luz incide sobre la molécula y se tiene oxígeno disuelto en la solución; efectos que no fueron considerados en el cálculo de los valores de $\log K$, reportados en la literatura [3–6]. Además, no se llevaron a cabo estudios de estabilidad de la MT que garanticen que el complejo formado, corresponde a MT y no a otra especie, producto de su degradación.

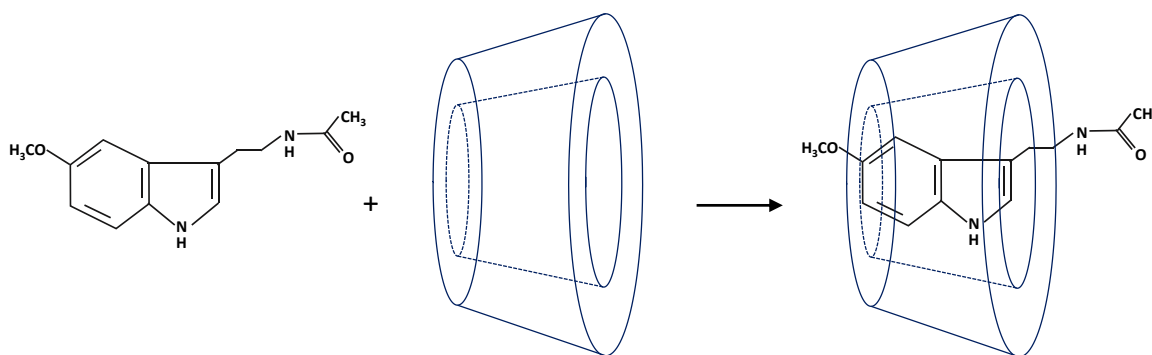


Figura 3.1. Mecanismo propuesto de la formación del complejo de inclusión al interactuar la MT y β CD.

En este trabajo, se calcula $\log K$ del complejo de inclusión MT- β CD a pH 3, 7 y 11.5 empleado la técnica de espectrofotometría UV-Vis y el programa computacional SQUAD [7]. Al realizar los experimentos, se protegió el sistema evitando los efectos de la luz y el oxígeno sobre la molécula, además se estudia la estabilidad de la MT en presencia de β CD a

pH 3. A partir de las constantes del complejo log K de las diferentes especies, así como de las constantes de acidez reportadas en el Capítulo 2 y el programa de procesamiento de datos MEDUSA [8], se determinaron las fracciones molares de cada especie de la MT y del MT- β CD; a partir de las cuales se construyó el diagrama de fracción molar-[β CD]-pH en 3D y los diagramas de fracción molar-pH en 2D. Finalmente se calculó log β a pH 3, mediante la técnica de voltamperometría cíclica y la metodología propuesta por Gao *et al.* [9], el cual se comparó con el valor obtenido mediante espectrofotometría.

3.1 Metodología

3.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se preparan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con agua burbujeada con N_2 . Durante los experimentos se mantiene una atmósfera inerte, evitando el contacto con el oxígeno; además se cubre el sistema protegiéndolo de la incidencia de la luz del ambiente. Los reactivos son los siguientes: MT (Sigma-Aldrich 98%), β CD (Fluka 97 %), NaCl (J.T. Baker 99%), NaOH (J.T. Baker 98.4%), HCl (J.T. Baker 37%), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70%), grafito en polvo (Alfa Aesar 99.9995%) y aceite mineral (Fluka).

3.1.2 Instrumentación

El estudio del comportamiento espectrofotométrico de la MT, se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 30, en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico. Los espectros de absorción se obtienen en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm con una velocidad de 960 nmmin^{-1} a temperatura ambiente. Para el estudio electroquímico, se utiliza un potencióstato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100, al cual se conecta una celda típica de tres electrodos: como contraelectrodo un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y, como electrodo de trabajo un electrodo de pasta de carbono (EPC) construido

con la metodología propuesta por Martínez *et al.* [10], la cual se describe con más detalle en el Capítulo 4. El pH se mide en un potenciómetro Seven Multi Mettler Toledo.

3.2 Resultados

3.2.1 Determinación de $\log K$ del complejo de inclusión de la MT y la β CD mediante espectrofotometría UV-Vis

Como ya se mencionó, el pH normal de los fluidos estomacales se encuentra en un intervalo de 1.5 a 3.5, por lo que es importante conocer si la formación del complejo de inclusión entre la especie H_2MT y la β CD se lleva a cabo bajo estas condiciones, ya que la formación de este complejo mejoraría la disolución y absorción de H_2MT en el tracto intestinal [2]. Por lo que, se realizó un estudio de estabilidad con una solución acuosa de H_2MT y β CD en una porción 1:1, a pH 1. La Figura 3.2(a), muestra una familia de espectros de absorción típicos de H_2MT a diferentes tiempos, obtenidos a partir de un sistema de MT 0.2 mM y β CD 0.2 mM en NaCl 0.1 M. Las bandas de absorción no presentan cambios con el tiempo, lo cual es más claro en la gráfica de la Figura 3.2(b), en donde se muestra el comportamiento de la absorbancia a $\lambda = 278$ nm como una función del tiempo.

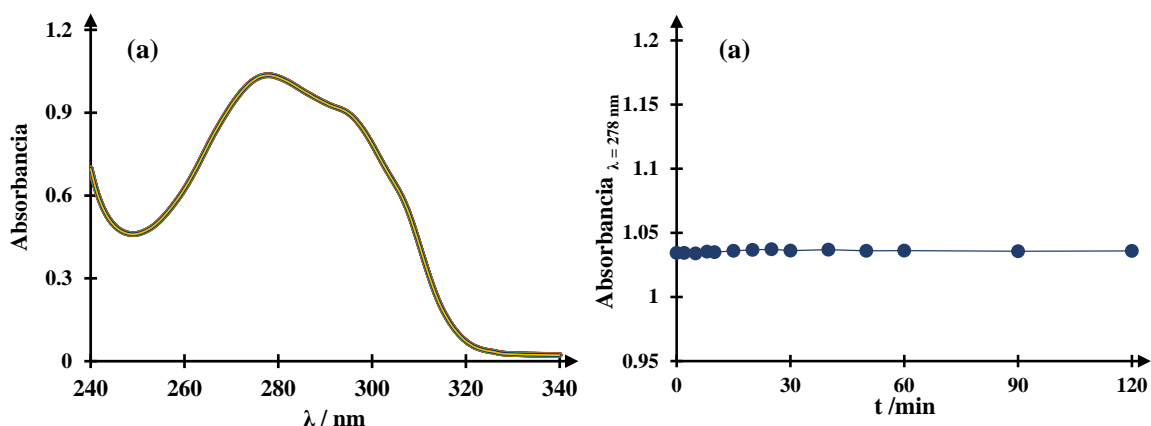


Figura 3.2. (a) Familia de espectros de absorción obtenidos en una solución acuosa de MT 0.2 mM y de β CD 0.2 mM con NaCl 0.1 M, a pH 1, a diferentes tiempos en un periodo de análisis de 120 min. (b) Tendencia de la absorbancia a $\lambda = 278$ nm en función del tiempo.

Estos resultados muestran que la especie H_2MT , se mantiene estable en presencia de la β CD, lo cual probablemente se deba a la inclusión de H_2MT en la β CD, que actúa como un protector

del medio. Para corroborar la formación del complejo de inclusión $H_2MT-\beta CD$, se calculó el valor de la constante de formación a pH 3, en donde existe un mayor predominio de la especie H_2MT , de acuerdo con el diagrama lineal de zonas de predominio construido a partir de los valores calculados de pK_a en la Unidad 2 (Figura 2.9).

Para calcular la constante de inclusión se lleva a cabo un estudio espectrofotométrico en el que se varía la concentraciones de la βCD a pH 3. La Figura 3.3 muestra los espectros de absorción de una solución acuosa de MT 0.2 mM en NaCl 0.1 M a pH 3, sin βCD (línea negra) y a diferentes concentraciones de βCD en un intervalo de 0.02 mM a 0.37 mM, donde se observa que la intensidad de la banda y hombro de absorción característicos de la H_2MT aumentan al ir adicionando βCD al sistema.

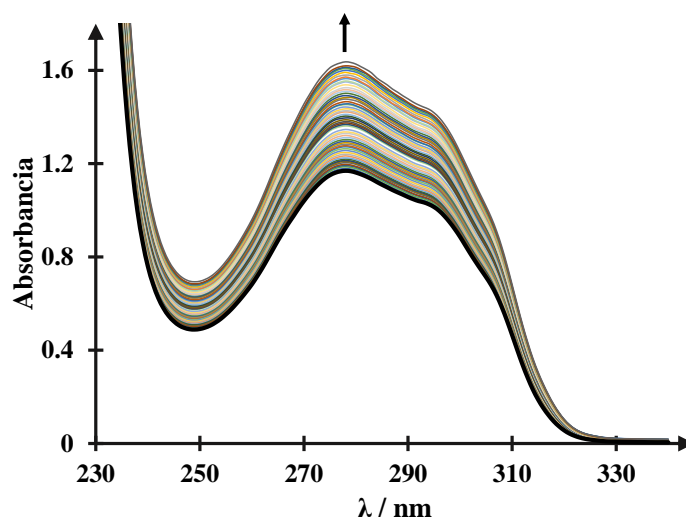


Figura 3.3. Espectros de absorción obtenidos en el sistema 0.2 mM de MT en 0.1 M de NaCl a pH 3, con diferentes concentraciones de βCD en un intervalo de 0.02 mM a 0.37 mM.

La Figura 3.4, presenta la variación de la absorbancia a λ de 278 nm como una función de la relación $[\beta CD] / [H_2MT]$, obtenida a partir de los espectros de la Figura 3.3. La gráfica muestra claramente un aumento de la absorbancia al incrementarse la relación $[\beta CD] / [H_2MT]$, así como un cambio de pendiente cercano a una relación molar con un valor de 1, lo que indica que la estequiometría para la formación del complejo de inclusión es 1:1, esto es congruente con lo demostrado en otros estudios mediante otras técnicas [3,5,6].

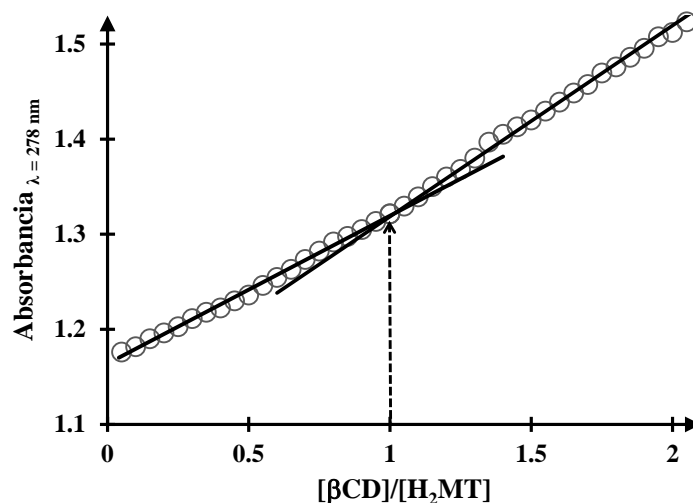


Figura 3.4. Tendencia de la Absorbancia para una $\lambda = 278$ nm en relación con la variación del cociente $[\beta\text{CD}] / [\text{H}_2\text{MT}]$, a pH 3, obtenida a partir de los espectros de la Figura 3.3.

Con los espectros de absorción reportados en la Figura 3.3 y usando el programa SQUAD [7], fue posible estimar la constante de formación del complejo de inclusión $\text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$. Al programa se le introdujeron 40 valores de $p\beta\text{CD}$ ($-\log [\beta\text{CD}]$) en un intervalo de longitud de onda de 240 a 360 nm, así como un posible modelo químico que considera el equilibrio de formación del complejo de inclusión en una relación 1:1. Al igual que para las constantes de acidez, el programa calcula la constante de formación global del complejo de inclusión, minimizando la suma de cuadrados entre las absorbancia obtenidas experimentalmente y las calculadas por el programa [7]. La constante de formación del complejo de inclusión $\text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$, para el equilibrio propuesto $\text{H}_2\text{MT} + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$ es $\log K = 3.07 \pm 0.06$ ($\sigma = 1.97 \times 10^{-2}$, $U = 3.86$, Datos = 4920).

En la literatura, se ha reportado el valor de la constante de formación del complejo de inclusión de la βCD con otros neurotransmisores del grupo amina, siguiendo la misma metodología empleada en este trabajo. En 2010 Palomar *et al.* [11], obtuvieron un valor $\log K = 3.77 \pm 0.16$, usando la especie totalmente protonada de la DA, en un medio acuoso (pH 3) [7]. En 2013 Gil *et al.* [12] estimaron un $\log K = 4.6358 \pm 0.0047$ y $\log K = 4.0579 \pm 0.0345$ utilizando la especie totalmente protonada (pH 2) y la especie monodesprotonada (pH 7) de la SR, respectivamente. Más recientemente, en 2016 Montes *et al.* [13], determinaron un $\log K = 2.3339 \pm 0.0138$ con la especie totalmente protonada de la HT (pH 3). Al comparar estos resultados con la constante de formación del $\text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$ obtenida en el presente

trabajo, se observa que los valores son del mismo orden de magnitud, lo cual indica que se tiene una buena estimación del log K para H₂MT-βCD.

De igual manera que en el caso de los valores de pK_a, el programa SQUAD calcula los ε de la especie H₂MT y el complejo de inclusión H₂MT-βCD en función de la λ, los cuales se reportan en la Tabla 3.1, junto con su error.

Tabla 3.1. Valores de algunos coeficientes de absortividad molar en función de la longitud de onda, calculados por el programa SQUAD [7], para las especies H₂MT y H₂MT-βCD.

λ / nm	$10^{-3} \epsilon_{H_2MT} / M^{-1}cm^{-1}$	$10^{-3} \epsilon_{H_2MT-\beta CD} / M^{-1}cm^{-1}$
240	8720 ± 363	3719 ± 109
245	5883 ± 241	2571 ± 72
250	5437 ± 221	2413 ± 66
255	6094 ± 248	2717 ± 74
260	7496 ± 306	3344 ± 92
265	9533 ± 388	4252 ± 116
270	11399 ± 464	5075 ± 139
275	12619 ± 512	5618 ± 154
280	12792 ± 522	5666 ± 157
285	12193 ± 493	5414 ± 148
290	11590 ± 469	5161 ± 141
295	11129 ± 452	4950 ± 135
300	9862 ± 406	4312 ± 122
305	8063 ± 337	3466 ± 101
310	5473 ± 236	2248 ± 71
315	2539 ± 123	897 ± 37
320	886 ± 48	264 ± 14
325	309 ± 20	79 ± 6
330	181 ± 15	39 ± 5
335	157 ± 15	31 ± 4
340	148 ± 14	25 ± 4
345	143 ± 14	25 ± 4
350	140 ± 14	22 ± 4
355	136 ± 14	21 ± 4
360	134 ± 14	19 ± 4

Al observar la Tabla 3.1, es posible notar que los coeficientes de absorptividad molar del complejo de inclusión $H_2MT-\beta CD$ tienen valores más grandes, lo cual puede apreciarse más claramente en la Figura 3.5, donde se presenta la gráfica de los ϵ en función de λ , con las barras de error correspondientes a la desviación estándar proporcionada por SQUAD [7]. Las barras de error de las curvas ϵ vs. λ , para la especie $H_2MT-\beta CD$ son grandes comparadas con las de la especie H_2MT , sin embargo ambas curvas muestran una diferencia significativa que demuestra la existencia de dos especies distintas.

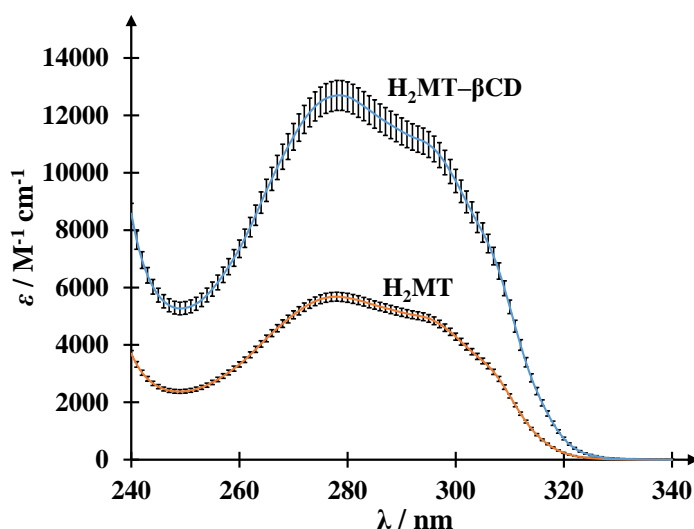


Figura 3.5. Coeficientes de absorptividad molar en función de la λ para la especie H_2MT y el complejo de inclusión $H_2MT-\beta CD$ generados por SQUAD [7].

La Figura 3.6, presenta la comparación de los espectros absorción obtenidos experimentalmente (\circ) a $p\beta CD$ ($-\log [\beta CD]$) de 3.34, 4.06 y 4.54, con los espectros de absorción teóricos, contruidos a partir de los valores de $\log K$ y de los ϵ proporcionados por SQUAD (Tabla 3.1). En las gráficas se observa la similitud de los espectros, lo que demuestra la exactitud de la constante de formación obtenida y la validez del procedimiento seguido.

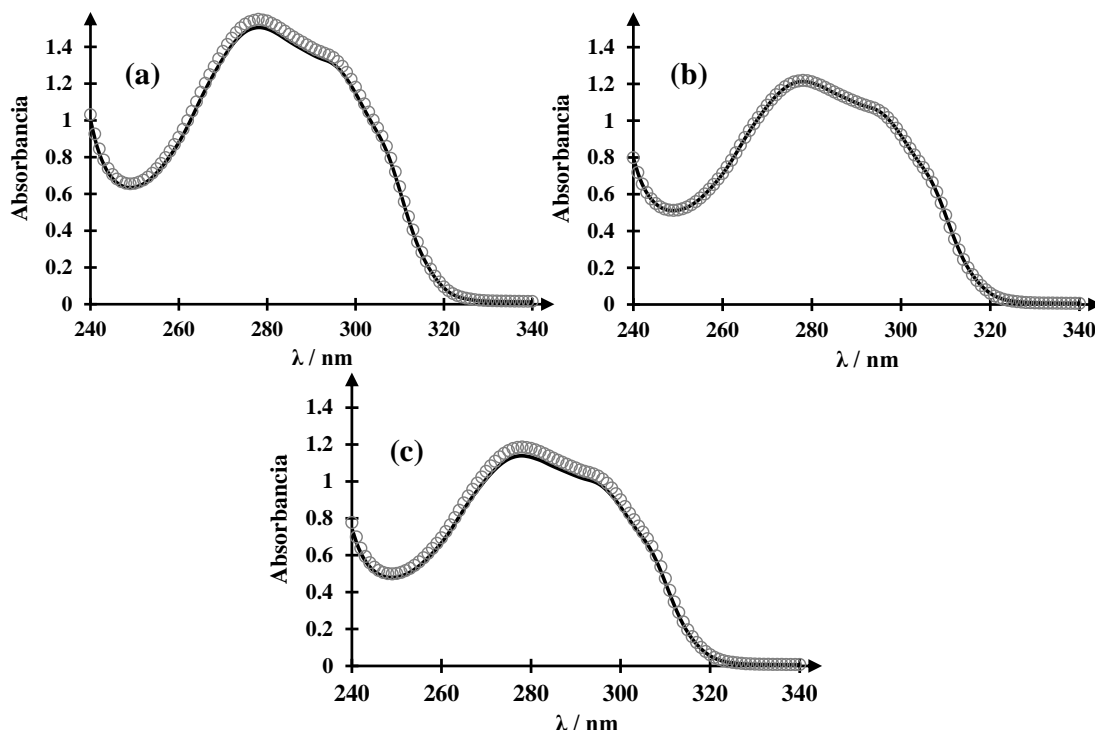


Figura 3.6. Comparación de los espectros de absorción experimentales (\circ) y teóricos ($—$) a tres diferentes valores de $p\beta\text{CD}$, los cuales son: a) 3.34, b) 4.06 y c) 4.54.

La Figura 3.7, muestra el diagrama de distribución de especie generado a partir de la metodología descrita por Rojas *et al.* [14–16] y la constante de equilibrio reportada. En el diagrama es posible observar que a un $p\beta\text{CD} > 3.07 \pm 0.06$ predomina la especie H_2MT , mientras que a un $p\beta\text{CD} < 3.07 \pm 0.06$ el complejo $\text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$ es la especie predominante.

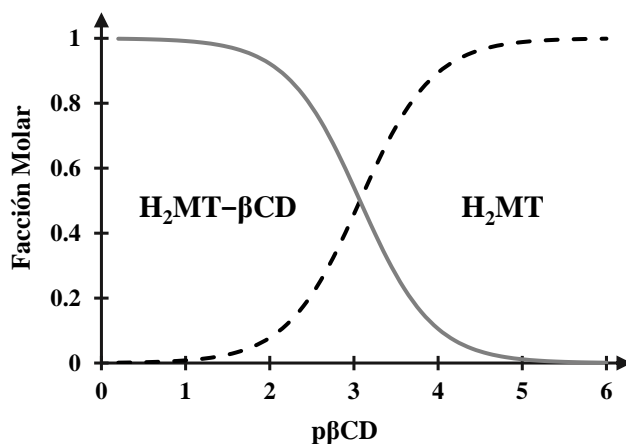


Figura 3.7. Diagrama de distribución de especie para: H_2MT (---) y el complejo $\text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$ (—) en función del $p\beta\text{CD}$, construido con la constante del complejo de formación calculada por SQUAD [7].

Empleando el mismo procedimiento, seguido en el cálculo de la constante de formación del complejo de inclusión a un valor de pH 3, también se calcularon los valores de log K a un valor de pH 7 (HMT⁻) y 11.5 (MT²⁻); los resultados se muestran en la Tabla 3.2 junto con los equilibrios propuestos.

Tabla 3.2. Constantes de formación del complejo de inclusión a diferentes valores pH, calculados a partir de los espectros de absorción experimentales y el programa computacional SQUAD [7].

pH	Equilibrio	log K
3	$\text{H}_2\text{MT} + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$	$3.07 \pm 0.06^*$
7	$\text{HMT}^- + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{HMT}^--\beta\text{CD}$	$2.94 \pm 0.01^{**}$
11.5	$\text{MT}^{2-} + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{MT}^{2-}-\beta\text{CD}$	$3.01 \pm 0.03^{***}$

* $\sigma = 1.97 \times 10^{-2}$, $U = 3.86$, Datos = 4920

** $\sigma = 1.19 \times 10^{-3}$, $U = 3.94 \times 10^{-3}$, Datos = 4920

*** $\sigma = 7.09 \times 10^{-3}$, $U = 7.91 \times 10^{-3}$, Datos = 4920

Utilizando los valores de las constantes de formación globales de acidez de la MT reportados en el Capítulo 2 y las constantes de formación del complejo de inclusión, log K, fue posible obtener los valores de las constantes de formación globales del complejo de inclusión, log β , los cuales se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Constantes de formación globales del complejo entre las diferentes especies de la MT y la βCD .

Equilibrios globales	log β
$\text{MT}^{2-} + 2\text{H}^+ + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{MT}-\beta\text{CD}$	19.04 ± 0.06
$\text{MT}^{2-} + \text{H}^+ + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{HMT}^--\beta\text{CD}$	13.14 ± 0.01
$\text{MT}^{2-} + \beta\text{CD} \rightleftharpoons \text{MT}^{2-}-\beta\text{CD}$	3.01 ± 0.03

Introduciendo las constantes de formación globales de la MT y las del complejo de inclusión, al programa de procesamiento de datos MEDUSA [8], fue posible determinar las fracciones

molares de cada especie de la MT y MT- β CD. Con esta información se construyó el diagrama en 3D de fracción molar- $[\beta$ CD]-pH, para la diferentes especies de la MT y de los complejos de inclusión MT- β CD, el cual se muestra en la Figura 3.8(a). También se hicieron los diagramas en 2D de fracción molar en función del pH, para los valores de $p\beta$ CD = 3.52 y $p\beta$ CD = 2.22, Figura 3.8(b) y 3.8(c), respectivamente. A un $p\beta$ CD = 3.52 es posible observar el predominio de las especies de la MT libres de β CD para todos los valores de pH, mientras que para un $p\beta$ CD = 2.22 predominan las especies del complejo de inclusión MT- β CD.

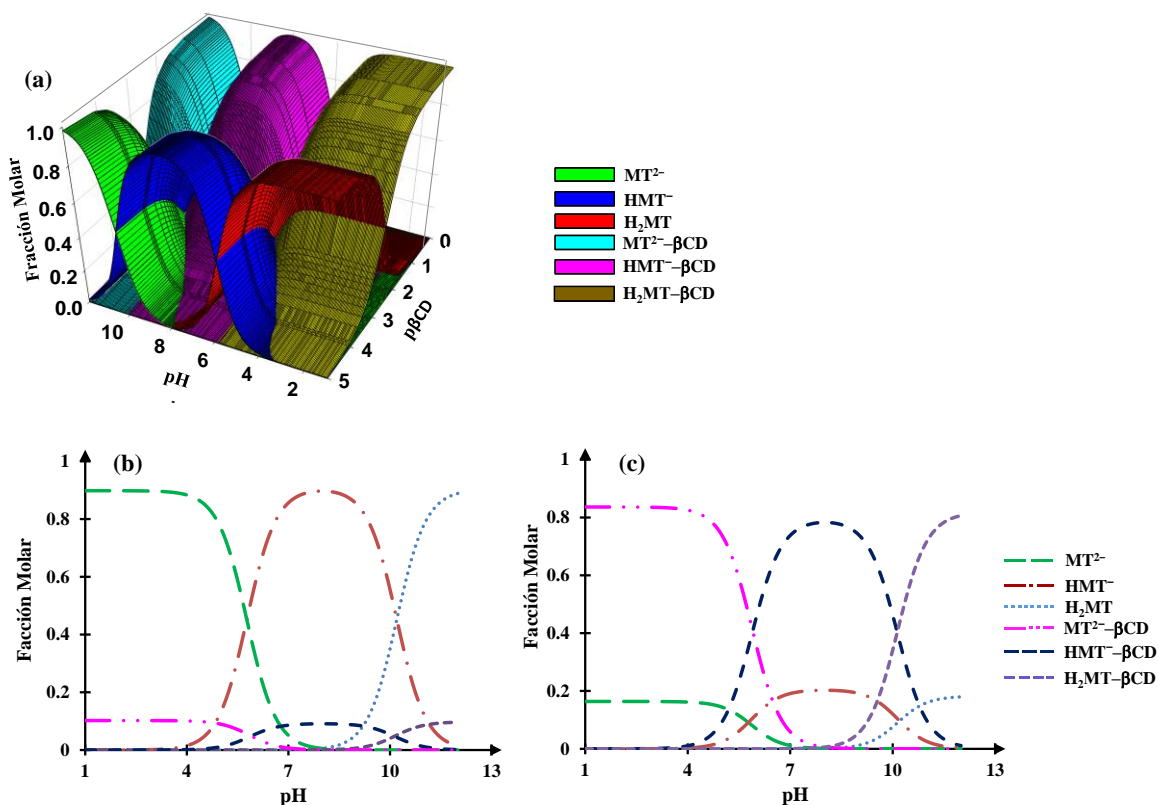


Figura 3.8. (a) Diagrama en 3D de fracción molar- $[\beta$ CD]-pH para las diferentes especies de la MT (H_2MT , HMT^- y MT^{2-}) y del complejo de inclusión MT- β CD ($H_2MT-\beta$ CD, $HMT^- -\beta$ CD y $MT^{2-}-\beta$ CD). Diagramas en 2D de la fracción molar en función del pH para los valores de $p\beta$ CD (b) 3.52 y (c) 2.22.

3.2.2 Determinación de $\log K$ del complejo de inclusión de la MT y la β CD mediante voltamperometría cíclica

Es posible calcular el valor de la constante del complejo de inclusión $H_2MT-\beta CD$, mediante un estudio electroquímico usando la técnica de voltamperometría cíclica y siguiendo la metodología propuesta por Gao *et al* [9], para ello, es necesario conocer el comportamiento electroquímico de H_2MT . En la Figura 3.10 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el sistema EPC/0.001M de $HClO_4$ a pH 3 en ausencia y en presencia de 0.2 mM de H_2MT . El voltamperograma cíclico sin H_2MT no presenta ninguna corriente farádica en el intervalo de potencial de 400 a 900 mV; mientras que el VC de la H_2MT presenta un pico anódico en 790 mV con una corriente, i_{pa} , de 22.7 μA , pico que se asocia a la oxidación de la MT, donde ésta pierde un electrón generando un radical catión. Al invertir el barrido de potencial el VC, muestra un pequeño pico catódico en 162 mV con una corriente, i_{pc} , de 2.1 μA , asociado a la reducción de los productos de oxidación de la MT de acuerdo con Radi *et al.* [17].

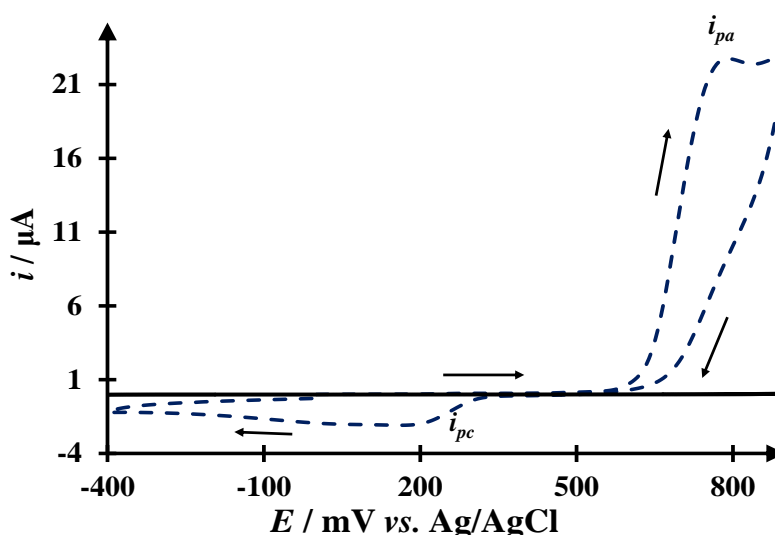


Figura 3.10. Voltamperogramas cíclicos del sistema EPC / 0.001M de $HClO_4$ (pH 3) con diferentes concentraciones de H_2MT : 0 (—) y 0.2 mM (---); ambos a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} .

Para calcular electroquímicamente la constante de formación del complejo de inclusión, se hizo un estudio voltamperométrico variando la concentración de la βCD en el sistema, en

donde la i_{pa} , disminuye con el incremento de la concentración de la β CD. Al graficar la i_{pa} obtenida en este estudio en función de la relación $[\beta\text{CD}] / [\text{H}_2\text{MT}]$, puede observarse este comportamiento (Figura 3.11), donde se notan dos tendencias lineales con un cambio de pendiente en una relación molar de 1, de igual forma que en el estudio espectrofotométrico; estos resultados confirman que la estequiometría de formación del complejo de inclusión 1:1.

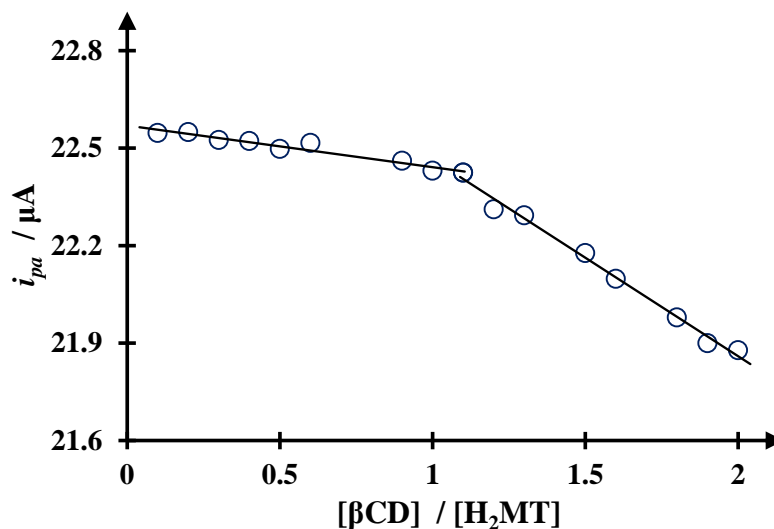


Figura 3.11. Variaciones de la corriente del pico de oxidación de la H_2MT i_{pa} en función de la relación molar $[\beta\text{CD}] / [\text{H}_2\text{MT}]$, obtenida del estudio de voltamperométrico variando la $[\beta\text{CD}]$.

Siguiendo la metodología propuesta por Gao *et al.* [9], es posible calcular la constante de formación del complejo de inclusión $\log K$, usando los resultados experimentalmente y empleando la ecuación (3.1).

$$i_{pa}^2 = K_d \frac{i_{pa(R)}^2 - i_{pa}^2}{[\beta\text{CD}]} + i_{pa(R-\beta\text{CD})}^2 \quad (3.1)$$

donde i_{pa} es la corriente del pico anódico observada al adicionar βCD al sistema, $i_{pa(R)}$ es la corriente del pico anódico de la especie en ausencia de βCD , $i_{pa(R-\beta\text{CD})}$ es la corriente del pico del complejo de inclusión y K_d la constante disociación del complejo de inclusión.

Con los valores experimentales i_{pa} y $i_{pa(R)}$ obtenidos del estudio voltamperométrico variando la concentración de la βCD en el sistema, se construyó una gráfica de la i_{pa}^2 contra $(i_{pa(R)}^2 - i_{pa}^2)/[\beta\text{CD}]$, para obtener K_d y $i_{pa(R-\beta\text{CD})}$ del valor absoluto de la pendiente y

ordenada al origen de la recta, respectivamente; además a partir del valor de K_d es posible obtener el $\log K$, a partir de $\log K = -\log K_d$. La Figura 3.12, muestra la gráfica de la i_{ap}^2 contra $(i_{pa(H_2MT)}^2 - i_{pa}^2)/[\beta CD]$, cuya expresión matemática del ajuste lineal es:

$$i_{pa}^2(\mu A^2) = -(0.00070 \pm 0.00003)(M)\left(\frac{i_{pa(H_2MT)}^2 - i_{pa}^2}{[\beta CD]}\right)(\mu A^2 M^{-1}) + (586.56 \pm 2.77)(\mu A^2)$$

con un coeficiente de correlación de 0.99. Con la pendiente de la ecuación se obtiene $K_d = 0.00070 \pm 0.00003$, que da un $\log K = 3.15 \pm 0.01$, el cual se aproxima al valor obtenido mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis y el programa computacional SQUAD [7].

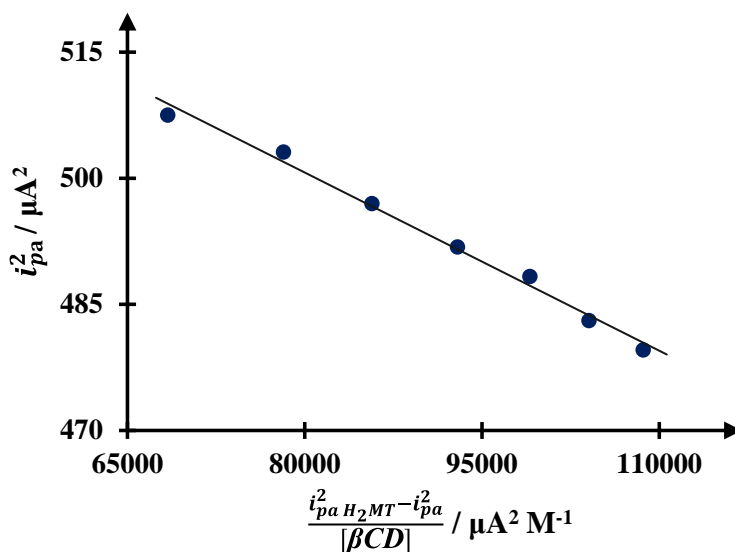


Figura 3.12. Tendencia de la intensidad de $i_{pa MT}^2$ con relación a la variación de $\frac{i_{pa H_2MT}^2 - i_{pa}^2}{[\beta CD]}$.

3.3 Conclusiones

A partir del estudio espectrofotométrico, se encontró que las tres especies de la MT forman complejos de inclusión en solución acuosa con la βCD , dando una relación estequiométrica de 1:1, en los tres casos. Para el caso del complejo $H_2MT-\beta CD$, $\log K$ estimado por voltamperometría dio un resultado similar al obtenido espectrofotométricamente, lo que confirma la fiabilidad del método y los resultados numéricos.

3.4 Referencias

- [1] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, 329 (2007) 1–11.
- [2] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems., Chem. Rev. 98 (1998) 2045–2076.
- [3] R.E. Galian, A. V. Veglia, R.H. de Rossi, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin enhanced fluorimetric method for the determination of melatonin and 5-methoxytryptamine, Analyst. 125 (2000) 1465–1470.
- [4] D. Bongiorno, L. Ceraulo, A. Mele, W. Panzeri, A. Selva, L.V. Turco, Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin, Carbohydr.Res. 337 (2002) 743–754.
- [5] M.L. Pola, M. Algarra, A. Becerra, M. Hernandez, Cyclodextrin Enhanced Spectrofluorimetric Determination of Melatonin in Pharmaceuticals and Urine, Anal. Lett. 33 (2000) 891–903.
- [6] H. Maeda, Y. Ogawa, H. Nakayama, Inclusion complexes of melatonin with modified cyclodextrins, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 78 (2014) 217–224.
- [7] D.J. Legget, Computational methods for the determination of formation constants, Plenum press, New York, 1995.
- [8] I. Puigdomenech, MEDUSA (Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms), [Http://www.kemi.kth.se/medusa/](http://www.kemi.kth.se/medusa/). (n.d.).
- [9] Z.-N. Gao, X.-L. Wen, H.-L. Li, Study of the inclusion complexes of catecholamines with β -cyclodextrin by cyclic voltammetry, Pol. J. Chem. 76 (2002) 1001–1007.
- [10] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric characterization of carbon paste electrodes with a nonconducting binder. Part I: Evidence of the influence of electroactive species dissolution into the paste on the voltammetric response, Electroanalysis. 10 (1998) 336–342.
- [11] M. Palomar-Pardavé, G. Alarcón-Ángeles, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, A. Rojas-Hernández, S. Corona-Avendaño, Electrochemical and spectrophotometric determination of the formation constants of the ascorbic acid- β -cyclodextrin and dopamine- β -cyclodextrin inclusion complexes, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 69 (2011) 91–99.
- [12] Y. Gil-Orozco, S. Corona-Avendaño, M. Romero-Romo, M.T. Ramírez-Silva, M. Palomar-Pardavé, Electrochemical and spectrophotometric assessment of the serotonin's complexation constants with β -cyclodextrin, 64th Annu. Meet. Int. Soc. Electrochem. Queretaro, México. (2013).
- [13] R. Montes-Sánchez, Estudio Espectroelectroquímico de la Histamina, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco, 2016.

- [14] A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez, J.G. Ibáñez, I. González, Construction of multicomponent Pourbaix diagrams using generalized species, *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 365–371.
- [15] A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez, I. González, Equilibria among condensed phases and a multi-component solution using the concept of generalized species. Part II. Systems with polynuclear species, *Anal. Chim. Acta.* 278 (1993) 335–347.
- [16] A. Rojas, I. González, Relationship of two-dimensional predominance-zone diagrams with conditonal constants for complexation equilibria, *Anal. Chim. Acta.* 187 (1986) 279–285.
- [17] A. Radi, G.. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.

Capítulo 4. Síntesis de NPsAu, construcción y modificación de los EPC

El estudio del comportamiento electroquímico de la MT, así como su determinación, requieren de la construcción previa de electrodos sensibles que permitan llevar a cabo los procesos redox de interés. Entre los electrodos que mejores resultados han dado, en la cuantificación de distintos fármacos, se encuentra el electrodo de pasta de carbono, EPC, cuya superficie es posible renovar y modificar con facilidad. En este sentido, las nanopartículas de oro sintetizadas con β -ciclodextrina, NPsAu• β CD, son una buena opción en la modificación de los EPC; que mejora su sensibilidad y selectividad, ya que favorecen las reacciones redox y hacen posible la formación de un complejo de inclusión [1]. Es por ello, que en este trabajo se utilizan EPC modificados con NPsAu• β CD, así como con NPsAu y β CD, con el propósito de conocer el efecto de cada material sobre la MT. La modificación del EPC con β CD y NPsAu• β CD, se hace mediante la técnica de voltamperometría cíclica aplicando diferente número de ciclos. Dada la cantidad de electrodos empleados en este trabajo, este Capítulo se enfoca en mostrar la construcción de los electrodos de trabajo, su modificación y su caracterización. En la sección de la metodología, se describe a detalle el método coloidal para la síntesis de las NPsAu, [2], el método propuesto por Pande *et al.*, para la síntesis de NPsAu con β CD, NPsAu• β CD, [3] y el procedimiento empleado para la construcción del electrodo de pasta de carbono, EPC, [4] y su modificación. También se muestra la caracterización de las NPsAu usando las técnicas de espectrofotometría UV-Vis y microscopio electrónico de barrido en modo de transmisión, MEB-T.

Por otra parte, una característica importante de los electrodos, es que al imponer un potencial acumulan carga en su superficie, de forma similar a un capacitor, formando una doble capa. La carga se acumula en la doble capa, hasta que fluye una corriente, i , conocida como capacitiva, cuya intensidad depende del área expuesta, A , de un electrodo, así como de espesor de la película formada sobre la superficie de un electrodo al modificarse [5]. En este sentido, conocer el perfil electroquímico de cada uno de los sensores, brinda una idea del área expuesta de la película formada sobre la superficie del electrodo, además permite apreciar la presencia de algún pico que pudiera interferir con la señal de la MT. En la sección

de resultados, se presenta el perfil electroquímico de cada sensor electroquímico, así como la polimerización de la β CD y NPsAu• β CD sobre el EPC aplicando diferentes ciclos. Con la finalidad de tener una mayor claridad, de la secuencia seguida en la obtención de los perfiles electroquímicos de cada uno de los sensores; así como de la polimerización de la β CD y de las NPsAu• β CD, en la Figura 4.1 se muestra de forma esquemática el procedimiento.

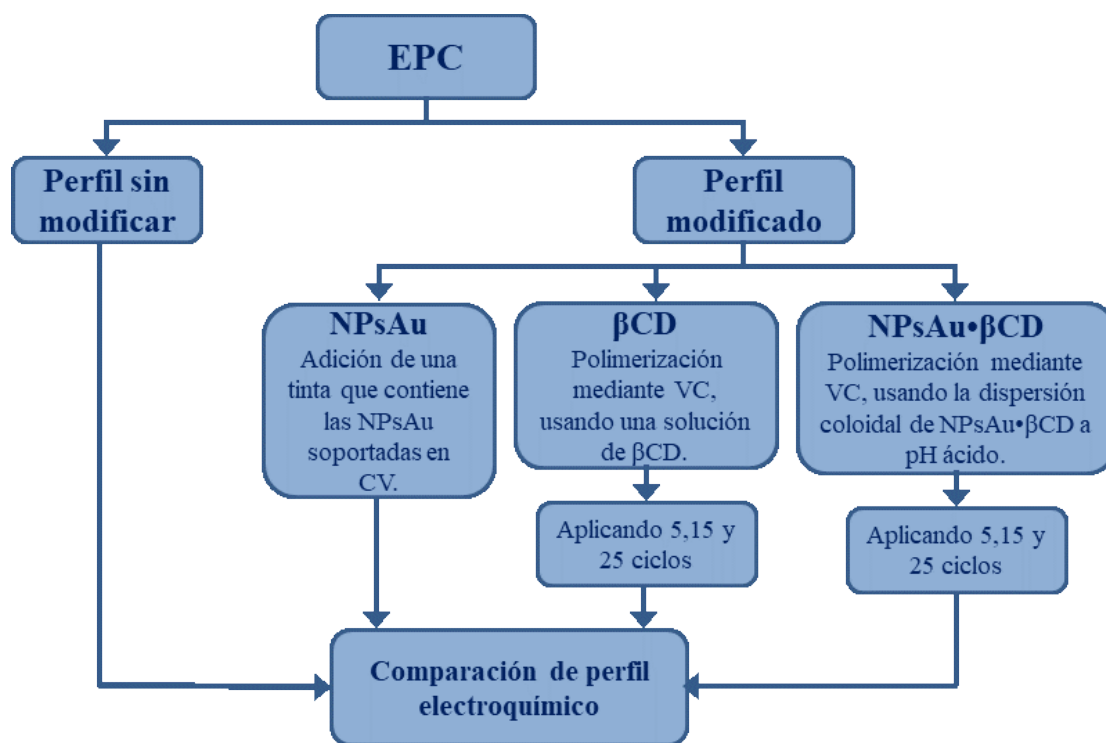


Figura 4.1. Esquema del procesamiento seguido en la obtención de los voltamperogramas cíclicos del EPC sin modificar y modificado, así como de la polimerización de la β CD y de las NPsAu• β CD.

4.1 Metodología

4.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se preparan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Mili-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con los siguientes reactivos: β CD (Fluka 97 %), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70 %), HAuCl_4 (Sigma-Aldrich $\geq 99.9\%$), $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ (Sigma-Aldrich

103.2%), NaOH (Sigma-Aldrich 98.4%), grafito en polvo (AlfaAesar 99.9995%), aceite mineral (Fluka), nafion a base de C_2H_5OH (solución de resina perfluorada, Sigma-Aldrich), C_2H_5OH (Sigma-Aldrich 96%) y carbón vulcan XC-72R (negro de carbono de alta conductividad en polvo con un diámetro promedio de 50nm, Cabot).

4.1.2 Instrumentación

La caracterización de las NPsAu y NPsAu• β CD, se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 30, en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico; así como en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, marca Carl Zeiss, modelo SUPRA 55 VP, con un detector de electrones transmitidos. Para el estudio electroquímico, se utiliza un potencióstato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100, al cual se conecta una celda típica de tres electrodos, como contraelectrodo con un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo un electrodo de pasta de carbono, EPC.

4.1.3 Síntesis y caracterización de las NPsAu

Las NPsAu se sintetizan a partir del método coloidal propuesto por Frens y Turkevich en 1973 [2], que consiste en adicionar 15 mg de ácido tetracloroaurico, $HAuCl_4$, en 200 mL de agua y calentar hasta la temperatura de ebullición; momento en el que se le agregan 5.7 mL de una solución 8.7 M de citrato trisódico, $Na_3C_3H_5O(COO)_3$. El calentamiento se sigue hasta que la solución adquiere un color rojo rubí indicativo de que se ha formado una dispersión coloidal (ver Figura 4.2); posteriormente, se deja enfriar, la agitación se mantiene constante durante todo el proceso.

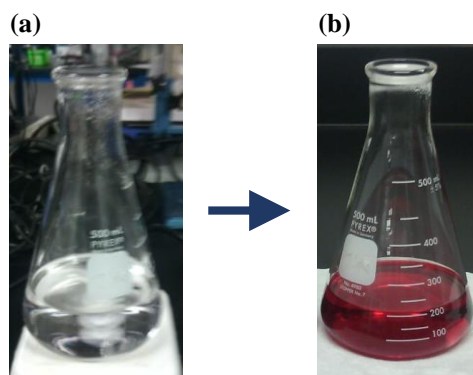


Figura 4.2. Solución de HAuCl_4 y $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ en H_2O con agitación constante: (a) sistema inicial y (b) dispersión coloidal de NPsAu.

La Figura 4.3, muestra el espectro UV-Vis de la dispersión coloidal, en el cual puede observarse la banda de resonancia del plasmón superficial, RPS, característica de las NPsAu. La banda de RPS presenta un máximo a una λ en 523 nm, indicando junto con el color rojo, que las NPsAu tienen un diámetro aproximadamente de 10 a 20 nm, de acuerdo con la literatura [6,7].

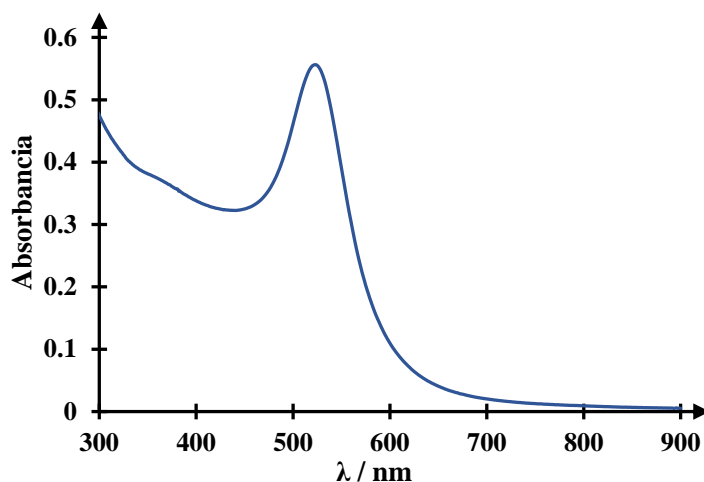


Figura 4.3. Espectro UV-vis de la dispersión coloidal de las NPsAu.

Las NPsAu se soportan en carbón vulcan, XC-72R, CV, adicionando 20 mg de éste a la dispersión coloidal y manteniendo una agitación constante por 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se filtran las NPsAu ya soportadas en el CV usando una bomba de vacío. El sólido filtrado, se deja secar aproximadamente por 30 minutos en una estufa a una temperatura de 40° C, obteniendo un polvo oscuro (Figura 4.4).

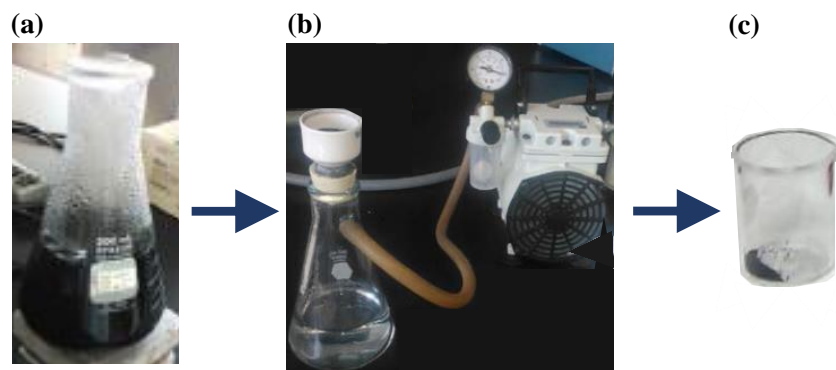


Figura 4.4. Esquema del procedimiento para la obtención de las NPsAu soportadas en CV: (a) dispersión coloidal de las NPsAu con CV en agitación, (b) Sistema de filtrado de NPsAu soportadas en CV y (c) polvo de NPsAu soportadas en CV después de secarse.

Con el fin de conocer la morfología de las NPsAu obtenidas, se emplea la técnica de MEB-T, para ello se colocan las NPsAu soportadas en CV en una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro (malla 200). La Figura 4.5, presenta la micrografía obtenida en donde se tiene partículas de forma quasi-esférica, con un tamaño promedio de 15 nm y una dispersión de tamaño homogéneo.

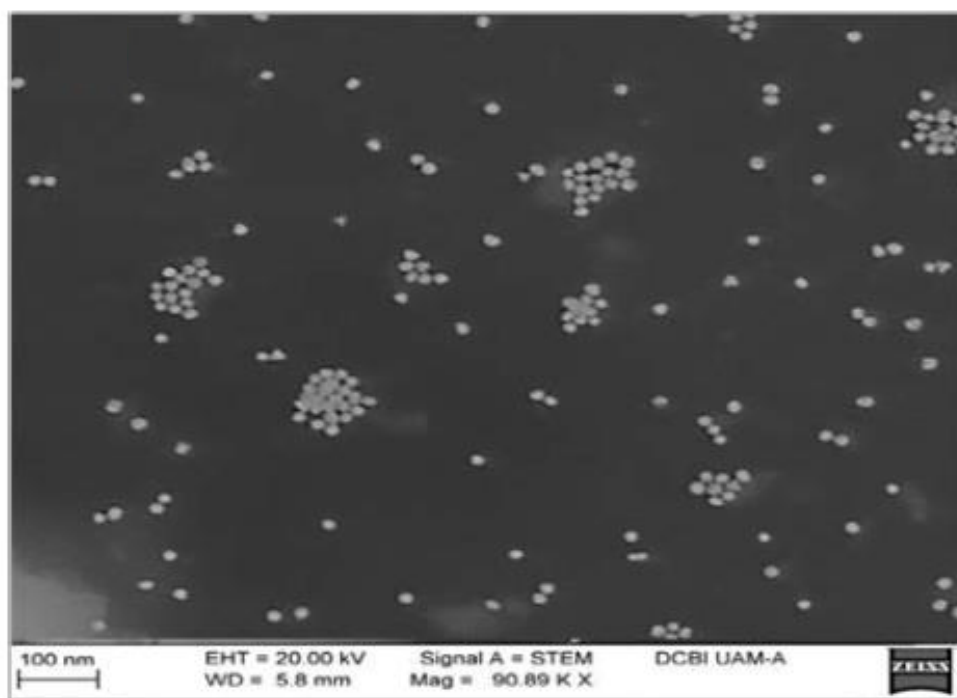


Figura 4.5. Imagen de la MEB-T de las NPsAu soportadas en CV.

4.1.4 Síntesis y caracterización de las $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$

Las NPsAu con βCD se preparan siguiendo la metodología propuesta por Pande *et al.*, [3] en donde se disuelven 0.7912 g de βCD en 98.6 mL de H_2O (0.007 M), calentando hasta 100°C con agitación constante. Una vez que se alcanza la temperatura se añade 0.4 mL de una solución 10 mM de HAuCl_4 , 2 minutos después se adiciona 1 mL de solución 1M de NaOH . El calentamiento y agitación se mantienen durante 20 min, tiempo en el que la solución adquiere un color rosa (Figura 4.6). Una vez transcurrido el tiempo, la solución se retira del calentamiento y se deja enfriar a temperatura ambiente, por último se introduce en un contenedor sellado [3].

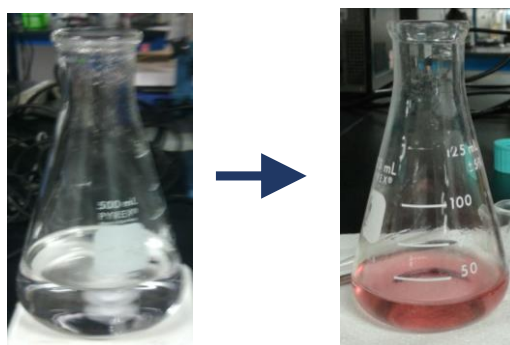


Figura 4.6. Solución de βCD , HAuCl_4 y NaOH en H_2O con agitación constante: (a) sistema inicial y (b) dispersión coloidal de NPsAu .

En la Figura 4.7, se muestra el espectro UV-Vis de la dispersión coloidal de $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$; el espectro de absorción presenta la banda de RPS característica de las NPsAu , con un máximo a λ de 522 nm. El color rosa que se observa en dispersión coloidal de $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ de la Figura 4.5, así como la banda de RPS, son indicativos de que se han obtenido NPsAu con un diámetro aproximadamente de 12 a 17 nm.

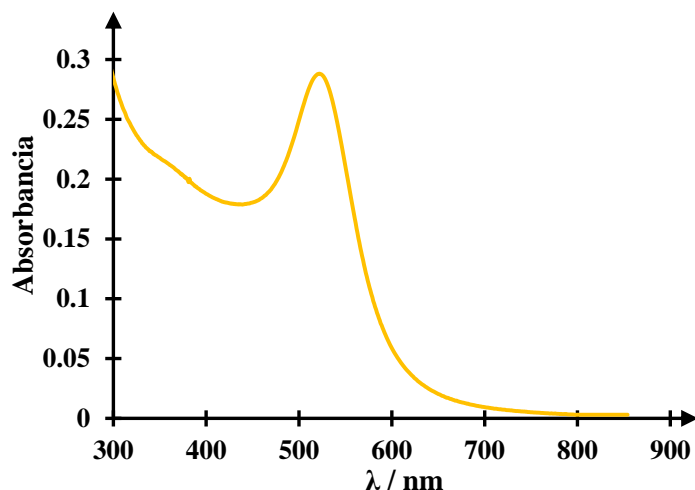


Figura 4.7. Espectro UV-vis de la dispersión coloidal de las NPs Au•βCD.

La Figura 4.8, presenta la micrografía obtenida de las NPs Au•βCD mediante la técnica de MEB-T; para lo cual se colocan las NPs Au•βCD en una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro (malla 200). En la micrografía puede observarse que las NPs Au•βCD, tiene una morfología quasi-esférica, con un tamaño promedio de 8 a 10.5 nm y una dispersión de tamaño homogéneo.

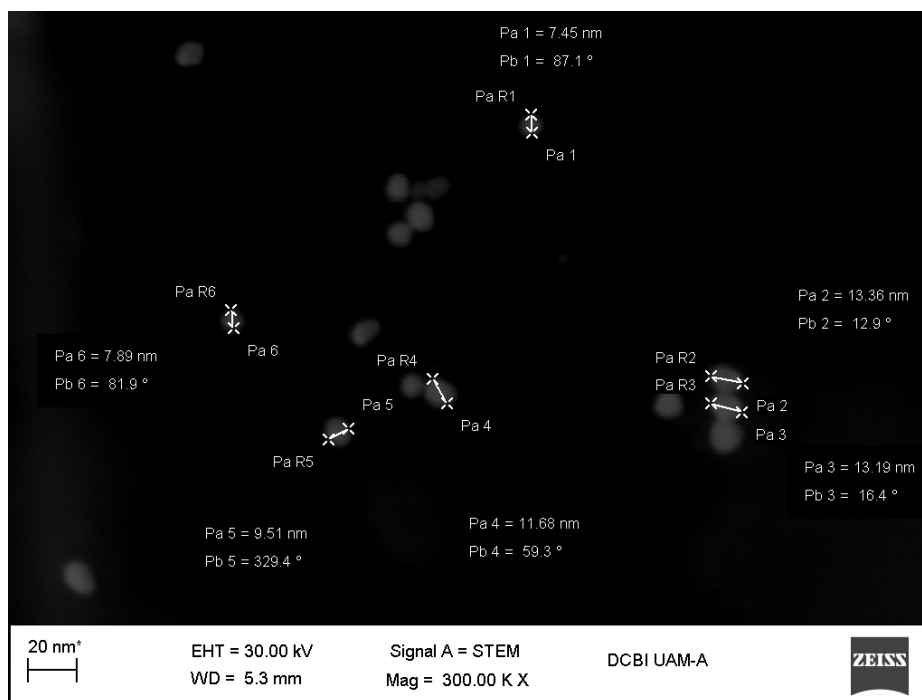


Figura 4.8. Imagen de la MEB-T de las NPs Au•βCD colocadas en una rejilla de cobre.

4.1.5 Construcción y modificación de EPC

4.1.5.1 Construcción del EPC

Los electros de pasta de carbono, EPC, se preparan siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al* [4]. Primero se mezcla grafito y aceite mineral en una proporción 1:1, hasta obtener una pasta homogénea; enseguida se introduce en un contenedor de plástico, donde se comprime con un émbolo a fin de evitar burbujas. Finalmente, se inserta un dispositivo de cobre para establecer el contacto eléctrico (ver Figura 4.9).



Figura 4.9. Electrodo de pasta de carbono y dispositivo con conector de cobre.

4.1.5.2 Modificación del EPC con NPsAu

Para la modificación del EPC con NPsAu, EPC-NPsAu, se elabora una tinta que se adiciona sobre el EPC. La tinta se prepara dispersando el polvo de las NPsAu soportadas en CV en 200 μL de etanol y 20 μL de nafion a base de alcohol, la mezcla se sonifica en un ultrasonido por 20 min. Posteriormente se depositaron 20 μL de esta tinta sobre el EPC, dejándolo secar por 20 minutos aproximadamente. Finalmente se adquiere una capa de color negro opaco, indicativo de que las NPsAu soportadas en CV han sido impregnadas. La Figura 4.10, muestra el esquema de la modificación con NPsAu soportadas en CV que podría llevarse a cabo en la superficie del EPC.

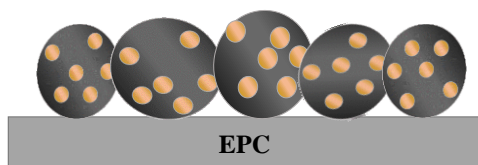


Figura 4.10. Representación esquemática de la modificación del EPC con NPsAu soportadas en CV.

4.1.5.3 Modificación del EPC con β CD

Para modificar el EPC con β CD, EPC- β CD, se polimeriza electroquímicamente una solución 0.007 M de β CD en 1 M de HClO_4 sobre la superficie del electrodo, tal como lo describe Roa *et al.* [8]. Mediante la técnica de voltamperometría cíclica, VC, se aplican 5, 15 o 25 ciclos, en dirección anódica a una velocidad de 100 mVs^{-1} , en una ventana de potencial de -500 a 1500 mV. A partir del mecanismo de adsorción de la β CD sobre el EPC y del mecanismo de propagación del polímero de β CD, propuestos por Roa *et al.* [8], se construye el esquema de la modificación superficial del EPC con β CD, (Figura 4.11).

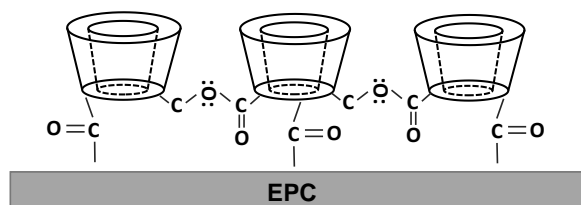


Figura 4.11. Esquema de la modificación del EPC con β CD, construido a partir del mecanismo de polimerización de la β CD sobre el EPC, propuesto por Roa *et al.* [8].

4.1.5.4 Modificación del EPC con $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$

Para la modificación EPC- $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$, se utiliza la dispersión coloidal de $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$ a pH ácido (agregando previamente HClO_4) y se sigue la misma metodología empleada para la polimerización de la β CD: usando la técnica de VC se aplican 5, 15 y 25 ciclos a una velocidad de 100 mVs^{-1} , en una venta de potencial de -500 a 1500 mV. Para caracterizar electroquímicamente las $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$, se probaron diferentes parámetros que pudieran interferir en el crecimiento de la película (Capítulo 5). La Figura 4.12, muestra el esquema propuesto para la modificación del EPC con $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$.

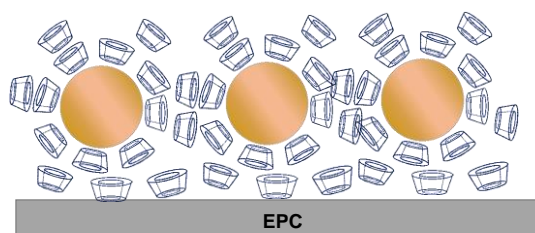


Figura 4.12. Representación esquemática para la modificación del EPC de carbono con NPsAu•βCD.

4.2 Resultados

4.2.1 Perfil electroquímico del EPC y del EPC modificado con NPsAu

En la Figura 4.13, se muestra el voltamperograma cíclico del perfil del (a) EPC y del (b) EPC modificado con NPsAu en una solución 0.001 M de HClO_4 (pH 3); aplicando una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} en dirección anódica, en una ventana de potencial de -200 a 900 mV. En la Figura se aprecia una i capacitiva mayor para el perfil del EPC modificado con NPsAu, lo que indica un probable aumento del A . Por otro lado, los voltamperogramas para ambos sistemas no muestran picos de oxidación o reducción que puedan traslaparse con la señal de la MT impidiendo su determinación.

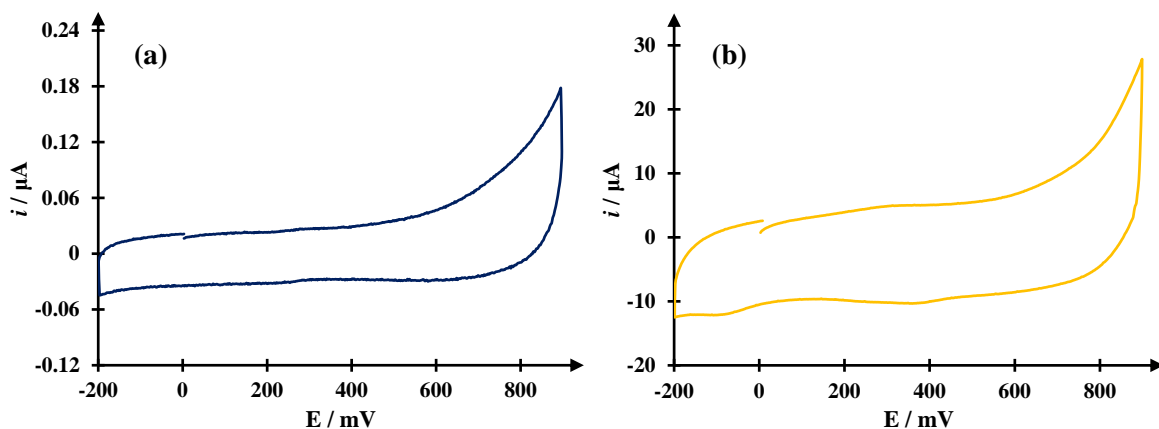


Figura 4.13. Perfil electroquímico del (a) EPC y del (b) EPC-NPsAu en 0.001M de HClO_4 (pH 3), obtenido a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} .

4.2.2 Perfil electroquímico del EPC modificado con β CD

Para poder comparar los efectos de la β CD en el perfil electroquímico del EPC, se polimeriza la β CD sobre su superficie mediante VC. En la Figura 4.14, se observan los voltamperogramas cíclicos que se obtienen al polimerizar las β CD sobre un EPC, empleando una disolución 0.007 M de β CD en 1 M de HClO_4 , aplicando (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} . El barrido se realizó en una ventana de potencial de -500 a 1500 mV, en dirección positiva. En los voltamperogramas, se observa una mayor respuesta en la corriente al aplicar 25 ciclos, así como un aumento de ésta en función del número de ciclos aplicados, lo que indica un crecimiento del polímero en función del número de ciclos. Los VC obtenidos para los tres sistemas muestran los picos y hombros característica de la β CD, tal como lo muestran Roa *et al.* en su estudio de la modificación electroquímica de EPC con β CD [8].

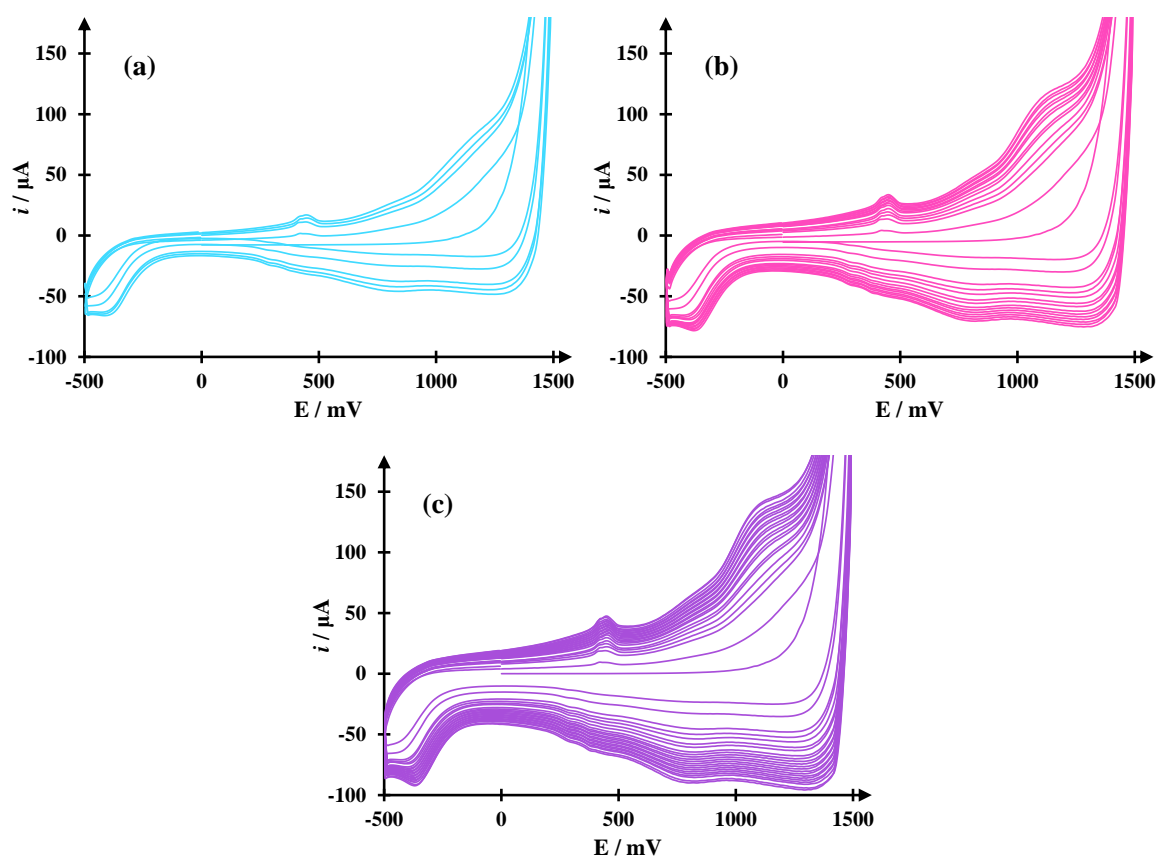


Figura 4.14. Voltamperogramas cíclicos de la polimerización de β CD en el sistema EPC/ 0.007 M de β CD en 1 M de HClO_4 , a 100 mVs^{-1} , aplicando (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos.

Con la finalidad de comprobar la formación del polímero de β CD en la superficie del electrodo, se grafican las cargas anódicas, Q_a , obtenidas mediante el cálculo del área bajo la curva en función del número de ciclos; lo cual es posible apreciar en la Figura 4.15, en donde las cargas aumentan en función del número de ciclos, indicando el crecimiento de la película polimérica a cada ciclo aplicado. La tendencia de la Q_a , evidencian dos regiones de polimerización, que van del ciclo 1 al 5 y del ciclo 5 al 25; lo que concuerda con los resultados reportados por Roa *et al.* [8].

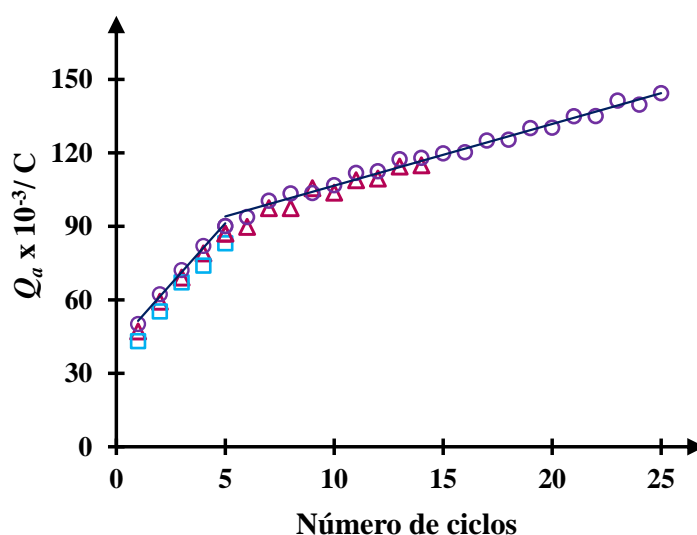


Figura 4.15. Gráfica de la tendencia de las Q_a en función número de ciclos aplicados en el programa de síntesis de la membrana de β CD sobre el EPC, al aplicar (\square) 5, (Δ) 15 y (\circ) 25 ciclos.

Una vez obtenidos los EPC- β CD aplicando diferentes ciclos, se les realiza un pretratamiento que permite estabilizar la superficie del electrodo, el cual consiste en aplicar varios ciclos sucesivamente hasta que la corriente capacitiva sea constante. Los perfiles electroquímicos de cada una de las polimerizaciones después del pretratamiento, se muestran en la Figura 4.16, en donde se observa que la corriente capacitiva aumenta con el número de ciclos aplicados, debido al crecimiento del polímero en la superficie del electrodo. Es importante mencionar que estos no presentan picos que pudieran interferir con la señal electroquímica de la MT.

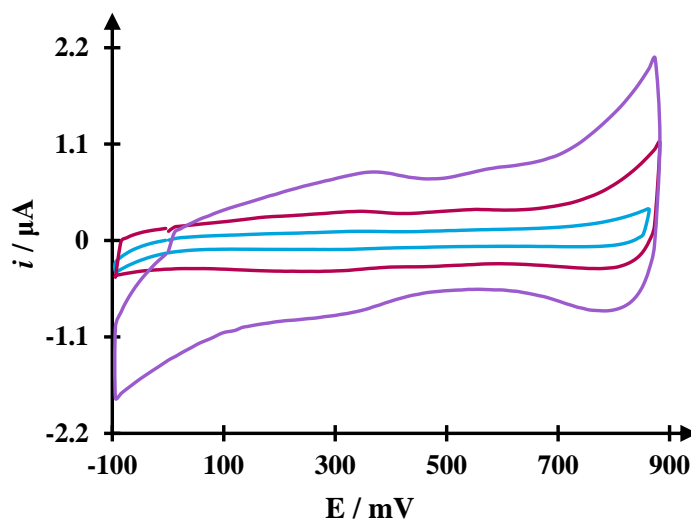


Figura 4.16. Perfiles electroquímicos del EPC-βCD modificado al aplicar (—) 5, (—) 15 y (—) 25 ciclos, obtenidos en 0.001M de HClO₄ a pH 3 a una velocidad de 20 mVs⁻¹.

4.2.3 Perfil electroquímico del EPC modificado con NPsAu•βCD

Para poder obtener el perfil electroquímico del EPC-NPsAu•βCD, se polimerizan las NPsAu•βCD sobre la superficie del EPC mediante VC. En la Figura 4.17, se aprecian los voltamperogramas cíclicos obtenidos al polimerizar las NPsAu•βCD sobre el EPC, usando la dispersión coloidal de NPsAu con 0.007 M de βCD en 1 M de HClO₄. La polimerización se llevó a cabo, aplicando (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹, en una ventana de potencial de -500 a 1500 mV. En los VC, se observa un aumento de la corriente en función del número de ciclos aplicados, lo que indica un crecimiento de la película, también se observan los picos característicos de la βCD reportados por Roa *et al.* [8], lo cual se analizará más adelante.

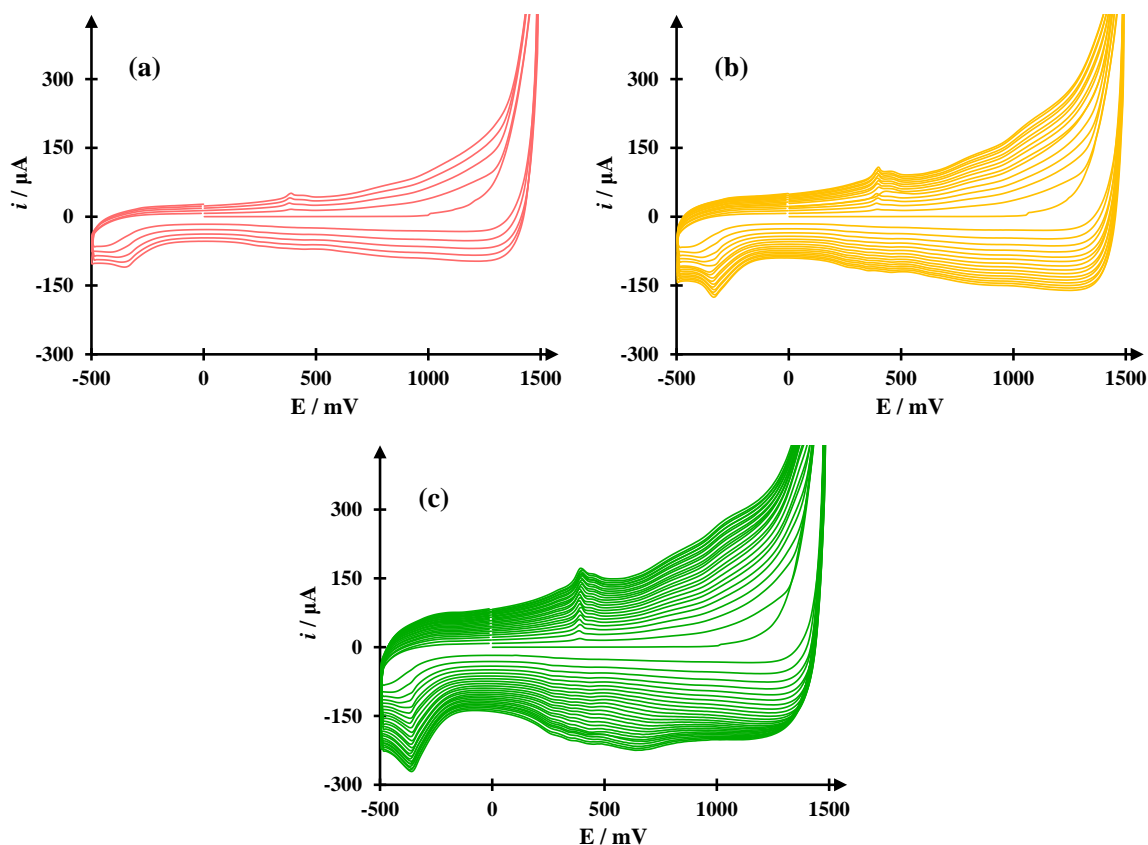


Figura 4.17. Voltamperogramas cíclicos de la polimerización de NPsAu•βCD, obtenidos en el sistema EPC/ 1 M de HClO₄, 0.007 M de βCD con NPsAu, a 100 mVs⁻¹, aplicando (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos.

Al graficar la tendencia de las cargas anódicas en función del número de ciclo, se observa un incremento considerable de las Q_a cuando aumenta el número de ciclos, lo que comprueba el crecimiento de la película de NPsAu•βCD en la superficie del electrodo, Figura 4.18. Por otro lado, la tendencia de las Q_a presenta tres regiones que indican cambios en el mecanismo de polimerización, que van del ciclo 1 al 6, del ciclo 6 al 17 y del ciclo 17 al 25, donde su incremento es cada vez menor.

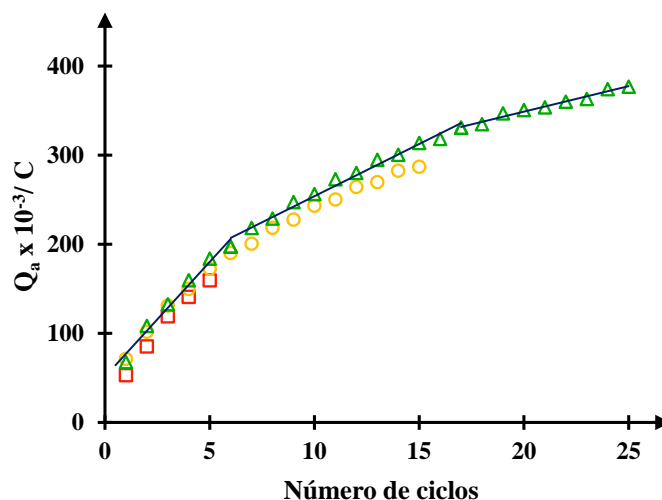


Figura 4.18. Gráfica de la tendencia de las Q_a en función número de ciclos crecidos de NPsAu• β CD sobre el EPC, al aplicar (□) 5, (○) 15 y (△) 25 ciclos.

En la Figura 4.19, se presenta la comparación de los perfiles del EPC-NPsAu• β CD modificado con 5, 15 y 25 ciclos, obtenidos después de aplicar el pretratamiento que estabilizar la superficie; en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . La intensidad de corriente capacitiva de los perfiles, se incrementa con el número de ciclos aplicados, debido al crecimiento de la película polimérica. Los perfiles no presentan picos de oxidación y reducción, que se traslapen con los de la MT.

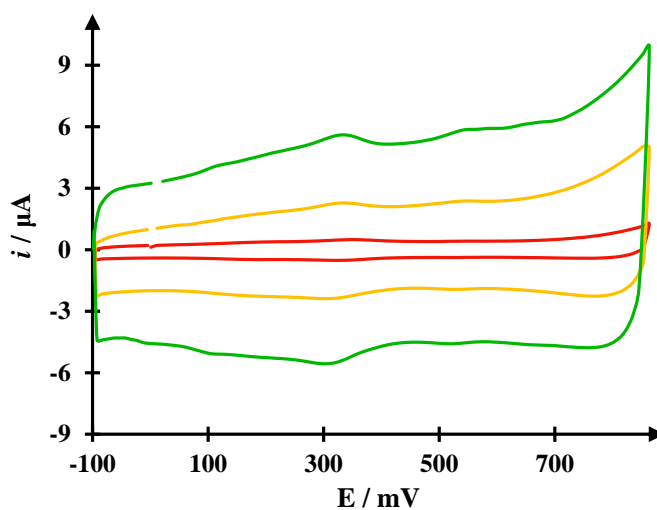


Figura 4.19. Perfiles electroquímicos del EPC-NPsAu• β CD modificado al aplicar (—) 5, (—) 15 y (—) 25 ciclos, obtenidos en 0.001M de HClO_4 (pH 3) a una velocidad de 20 mVs^{-1} .

4.2.5 Comparación del perfil electroquímico del EPC sin modificar y modificado

Con el propósito de poder apreciar la diferencia entre los perfiles de los EPC, EPC- β CD y los EPC-NPsAu• β CD, en la Figura 4.20 se hace una comparación de los voltamperogramas cíclicos de los EPC, modificados con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. En ésta figura puede observarse, que los VC de los EPC-NPsAu• β CD muestran una intensidad de corriente mayor; por lo que puede deducirse que las NPsAu influyen favoreciendo el crecimiento de la película.

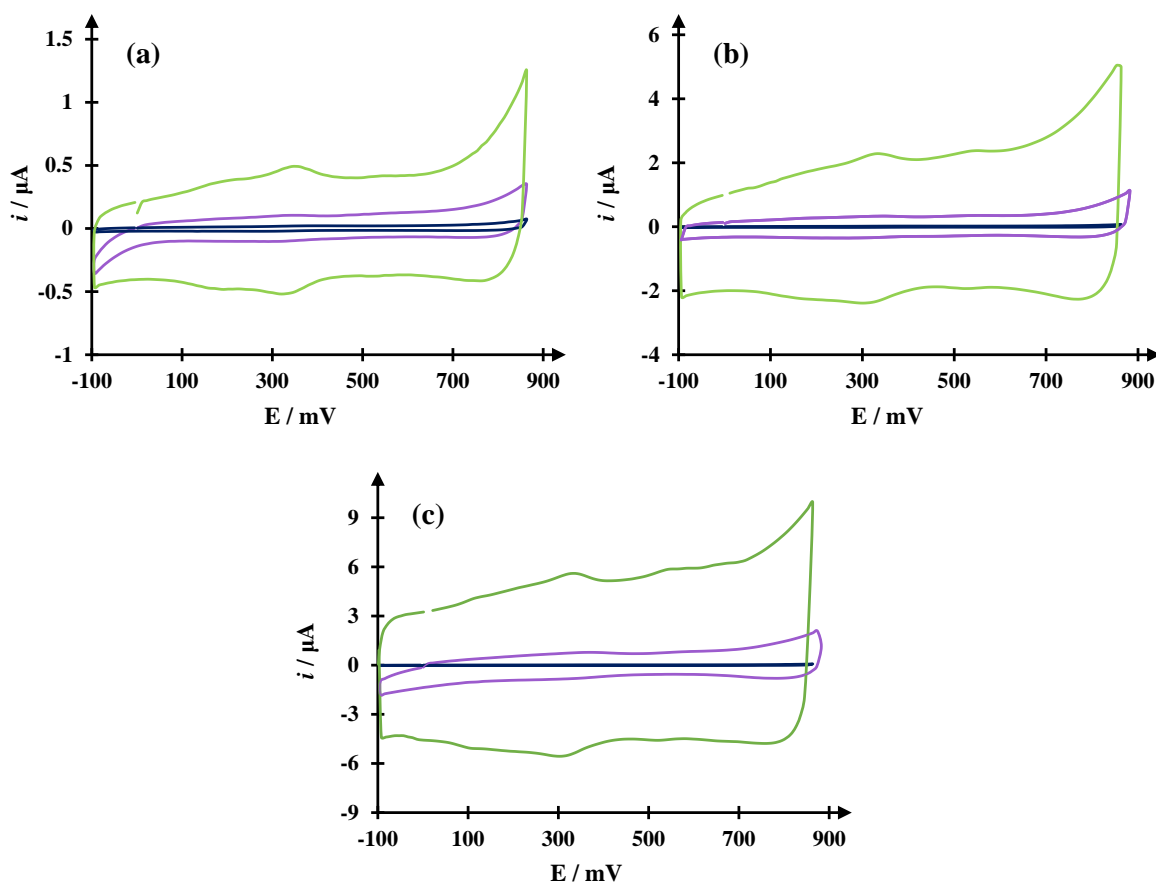


Figura 4.20. Comparación de los perfiles electroquímicos del EPC (—), EPC- β CD (—) y EPC-NPsAu• β CD (—) modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. Los perfiles se obtuvieron en una solución 0.001M de HClO_4 (pH 3), aplicando una velocidad de 20 mVs^{-1} .

Finalmente, se comparan los perfiles electroquímicos del EPC sin modificar y modificados con NPsAu, β CD y NPsAu• β CD en la Figura 4.21. En el caso del EPC- β CD y del EPC-NPsAu• β CD, se comparan los perfiles obtenidos al aplicar 25 ciclos, ya que son los que

tuvieron una mayor respuesta de corriente. Como puede apreciarse en la figura, el EPC-NPsAu y el EPC-NPsAu• β CD tienen una i capacitiva mayor, a la del EPC- β CD y el EPC sin modificar. La i capacitiva anódica para el EPC-NPsAu y el EPC-NPsAu• β CD son del mismo orden, sin embargo la i capacitiva catódica del EPC-NPsAu es mayor. Por otro lado, el EPC tiene una i capacitiva prácticamente de cero.

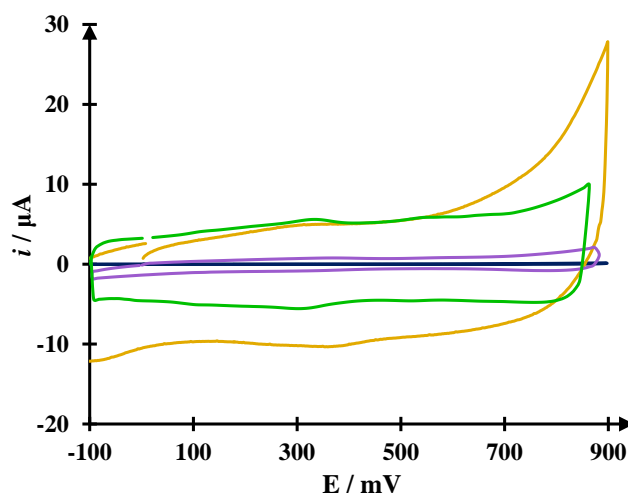


Figura 4.21. Comparación de los voltamperogramas cíclicos del EPC (—), EPC-NPsAu (—), EPC- β CD_(25 ciclos) (—) y EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos) (—), obtenidos en una solución 0.001M de HClO₄ (pH 3), a una velocidad de 20 mVs⁻¹.

Los resultados indican, que al modificar el EPC con NPsAu y NPsAu• β CD (25 ciclos) se forma una película de un espesor mayor en comparación con el EPC modificado con β CD (25 ciclos). La modificación del EPC con NPsAu mejora la respuesta de la i capacitiva, sin embargo su preparación requiere de un proceso extenso y tardado, a diferencia del EPC modificado con NPsAu• β CD, cuya preparación es mucho más sencilla y rápida.

4.3 Conclusiones

Los perfiles electroquímicos de los distintos sensores, no presentan picos de oxidación o reducción que puedan traslaparse con la señal de la MT impidiendo su determinación. Los perfiles del EPC modificado con NPsAu, β CD y NPsAu• β CD, presentan un corriente capacitiva mayor a la del EPC sin modificar, lo que demuestra la modificación de la

superficie del electrodo mediante la formación de una película, cuyo espesor podría ser mayor para el EPC modificado con NPsAu y NPsAu• β CD. Por otra parte, los resultados experimentales de la polimerización muestran que al modificar el EPC con β CD o NPsAu• β CD, se forma una película que crece con el aumento número de ciclos aplicados.

4.4 Referencias

- [1] Y. Gil-Orozco, Aplicación de nanopartículas de oro en la determinación de serotonina, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco, 2013.
- [2] G. Frens, Z. Kolloid, J. Turkevich, J. Hillier, P.C. Stevenson, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22.
- [3] S. Pande, S.K. Ghosh, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Basu, S. Jana, et al., Synthesis of Normal and Inverted Gold - Silver Core - Shell Architectures in β -Cyclodextrin and Their Applications in SERS, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 10806–10813.
- [4] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response, *Electroanalysis.* 10 (1998) 336–342.
- [5] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2da. edici, JOHN WILEY & SONS, IN, United States of America, 2001.
- [6] H.N. Verma, P. Singh, R.M. Chavan, Gold nanoparticle: Synthesis and characterization, *Vet. World.* 7 (2014) 72–77.
- [7] J. Kimling, M. Maier, V. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, a Plech, et al., Turkevitch method for gold nanoparticle synthesis revisited, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 15700–15707.
- [8] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.

Capítulo 5. Cálculo de la capacitancia y área electroactiva de los EPC y caracterización de la polimerización de las NPsAu•βCD

Una de las características más importantes de los electrodos electroquímicos, es su área expuesta a los procesos redox, llamada propiamente área electroactiva, (A); otra característica importante es el espesor de la película formada en la superficie de los electrodos al modificarlos. Un electrodo modificado con una película de espesor considerable y un A grande, será más sensible. Es por ello, que este Capítulo se enfoca en el cálculo del A , así como de la capacitancia, C_p , la cual está relacionada con el A y el espesor de la película. La Figura 5.1, muestra de forma esquemática el proceso seguido para la estimación de estos valores, el cálculo de la C_p se realizó para el EPC sin modificar y modificado con β CD y NPsAu• β CD aplicando 25 ciclos, ya que estos fueron los que tuvieron una mayor repuesta de i catódica. Para el cálculo del A , se llevó a cabo la caracterización de todos los EPC en el sistema $K_3Fe(CN)_6$ 0.006 M en 1M de KNO_3 , sin embargo sólo fue posible calcular los valores para el EPC sin modificar y modificado con β CD y NPsAu• β CD aplicando 5 ciclos, ya que fueron los únicos procesos controlados por difusión.

Por otro lado, el mecanismo de adsorción y de polimerización de la β CD sobre un EPC, ya se ha estudiado electroquímicamente por Roa *et al.* [1] como se mostró en el Capítulo 1; mientras que la influencia de la concentración del $HClO_4$ en la electropolimerización de la β CD sobre un EPC, se caracterizó por Corona *et al.* [2]. Sin embargo, a la fecha no se ha caracterizado la polimerización de NPsAu• β CD sobre el EPC; es por ello que en este Capítulo también, se presentan la influencia de diferentes factores en el crecimiento de la película de NPsAu• β CD como: el número de ciclos de barrido de potencial aplicados, la ventana de potencial y la concentración de ácido perclórico.

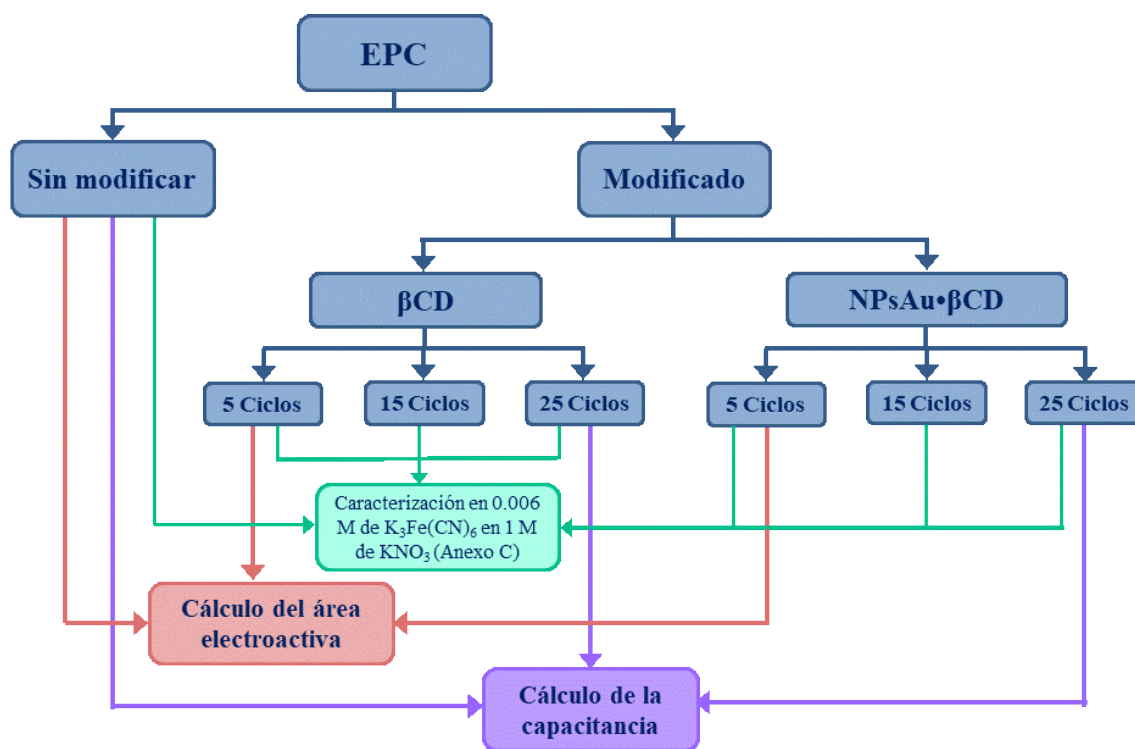


Figura 5.1. Esquema del procesamiento seguido para el cálculo de la C_p y A del EPC sin modificar y modificado.

5.1 Metodología

5.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se preparan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con los siguientes reactivos: βCD (Fluka 97%), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70%), HAuCl_4 (Sigma-Aldrich $\geq 99.9\%$), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Mellinckrodt 99.925%), NaOH (Sigma-Aldrich 98.4%), KNO_3 (Tecsiqum99%), grafito en polvo (AlfaAesar 99.9995%) y aceite mineral (Fluka).

5.1.2 Instrumentación

La caracterización de las NPsAu• β CD electropolimerizadas, se lleva a cabo en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, marca Carl Zeiss, modelo SUPRA 55 VP, con un detector de electrones de barrido. Para el estudio electroquímico, se utiliza un potenciostato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100, al cual se conecta una celda típica de tres electrodos, como contraelectrodo con un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo un electrodo de pasta de carbono (EPC).

5.2 Resultados

5.2.1 Cálculo de la capacitancia y del área electroactiva del EPC sin modificar y modificado con β CD y NPsAu• β CD

5.2.1.1 Cálculo de la Capacitancia

Para el cálculo de la C_p mediante la técnica de voltamperometría cíclica, se realiza un estudio de velocidad sin especie electroactiva, por lo que la corriente obtenida se debe sólo a la carga de la doble capa. En la Figura 5.2, se presentan los VC obtenidos en el sistema (a) EPC, (b) EPC- β CD_(25 ciclos) y (c) EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos)/ 0.1 M de HClO₄, a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 10 a 300 mVs⁻¹. Al aumentar la velocidad de barrido se observa un incremento en la corriente capacitiva, el cual es mayor al usar un EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos).

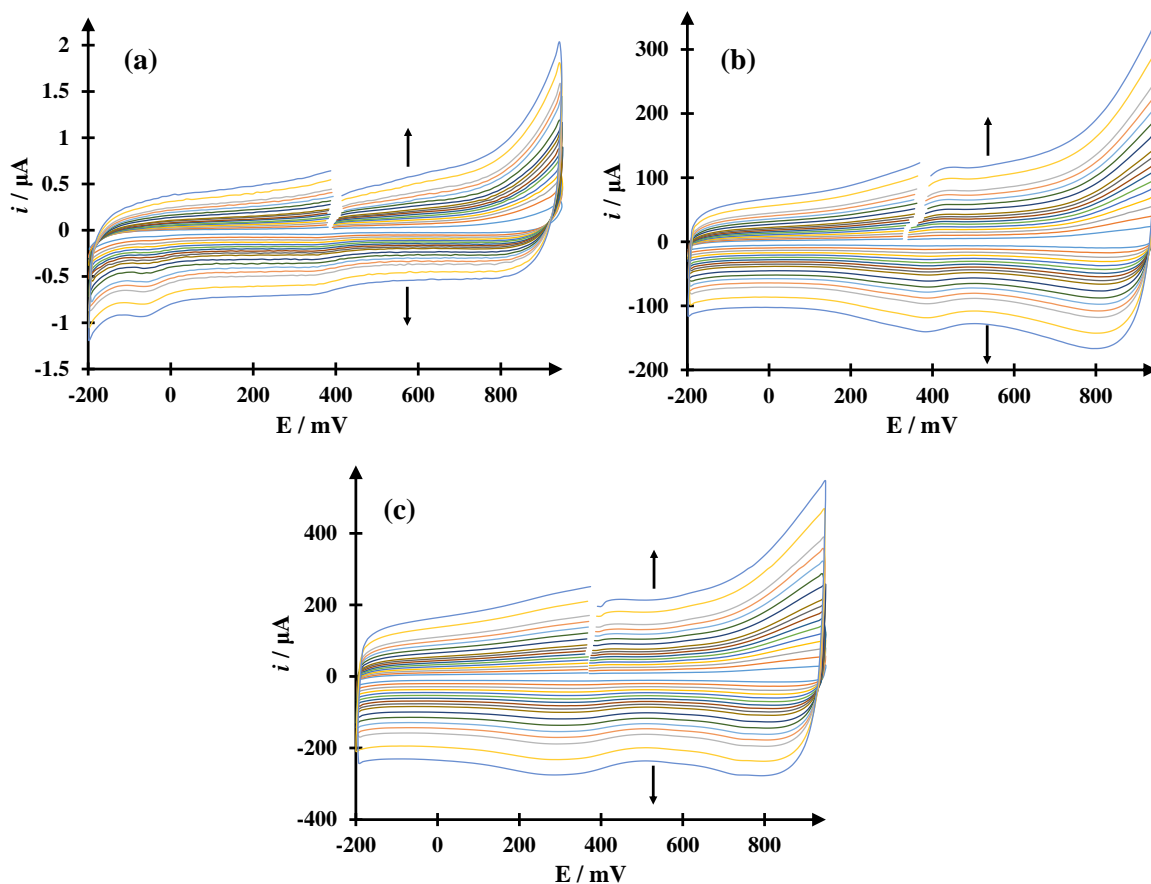


Figura 5.2. Voltamperogramas cíclicos para los sistemas: (a) EPC, (b) EPC- β CD_(25 ciclos) o (c) EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos) / 0.1 M de HClO₄ a diferentes velocidades de barrido (10-300 mVs⁻¹).

En la Figura 5.3(a) se muestra la comparación de los voltamperogramas cíclicos obtenidos para los tres sistemas: EPC (—), EPC- β CD_(25 ciclos) (—) y EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos) (—) / 0.1 M de HClO₄ a 100 mVs⁻¹, en donde puede apreciarse que el VC para el EPC modificado con NPsAu• β CD tiene una mayor intensidad de i capacitiva. A partir de los datos experimentales obtenidos en los estudios de velocidad, se grafica la tendencia de la intensidad corriente anódica, i_a , con relación a la variación de la velocidad, v , a un potencial de 600 mV, Figura 5.3(b); dando como resultado una relación lineal de la i_a en función de la v , para todos los casos, con un valor de pendiente más grande para la curva correspondiente al EPC-NPsAu• β CD, lo que indica una mayor capacitancia.

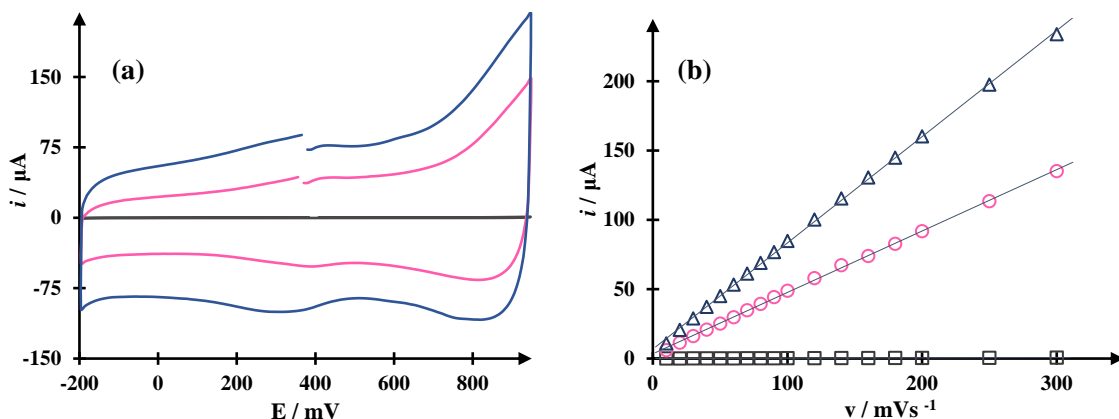


Figura 5.3. (a) Voltamperogramas cíclicos obtenidos en los sistemas: EPC (—), EPC-βCD (—) y EPC-NPsAu•βCD (—) /0.1 M de HClO₄, a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹. (b) Tendencia de la i_a en función de la v , a 600 mV, para EPC (□), EPC-βCD (○) y EPC-NPsAu•βCD (Δ), gráfica construida a partir de los datos experimentales de los estudios de velocidad (Figura 5.2).

Con el fin de obtener valores cuantitativos de la capacitancia asociada al proceso de la doble capa, se emplea la siguiente ecuación (5.1) que relaciona la capacitancia con la corriente, la cual se deduce a partir de $i = dQ/dt$ y $C_p = dQ/dE$ [3]:

$$i = C_p v \quad (5.1)$$

en donde i es la corriente capacitiva, C_p es la capacitancia y v la velocidad de barrido. De acuerdo con esta ecuación, las capacitancias se obtienen a partir de las expresiones matemáticas de las curvas i_a vs v y de la ecuación (5.1). En la Tabla 5.1, se presentan las ecuaciones de las curvas, los coeficientes de correlación (R^2) y las capacitancias obtenidas; donde se observa, que la C_p para el EPC modificado con NPsAu•βCD tiene un valor más alto, lo que señala un área expuesta mayor.

Tabla 5.1. Ecuaciones de las curvas $i_a = f(v)$ y C_p .

Electrodo	Ecuación	R^2	$C_p \times 10^4 / F$
EPC	$i_a(\mu A) = (1.99 \pm 0.01) (\mu A V^{-1} s)v + (0.03 \pm 0.001)(\mu A)$	0.999	0.019 ± 0.0001
EPC-βCD _(25 ciclos)	$i_a(\mu A) = (442.85 \pm 3.00) (\mu A V^{-1} s)v + (3.39 \pm 0.41)(\mu A)$	0.999	4.428 ± 0.03
EPC-NPsAu•βCD _(25 ciclos)	$i_a(\mu A) = (765.88 \pm 4.52) (\mu A V^{-1} s)v + (6.80 \pm 0.62)(\mu A)$	0.999	7.658 ± 0.04

Con el propósito de verificar los valores de capacitancias obtenidos, se utilizó la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, EIE, para los diferentes sistemas. En la Figura 5.4, se presentan los diagramas de Nyquist obtenidos al utilizar un (a) EPC, (b) EPC- β CD₍₂₅ ciclos) y (c) EPC-NPsAu• β CD₍₂₅ ciclos); en un medio 0.1 M de HClO₄, imponiendo el potencial de circuito abierto, en un intervalo de frecuencias de 100,000 Hz a 0.01 Hz, también se muestra el circuito equivalente que reproduce los espectros de impedancia (circuito Randles), en donde la resistencia de la solución R_{sol} , está conectada en serie a la resistencia de la transferencia de carga, R_{tc} , la cual a su vez, está en paralelo con la capacitancia de la interfase.

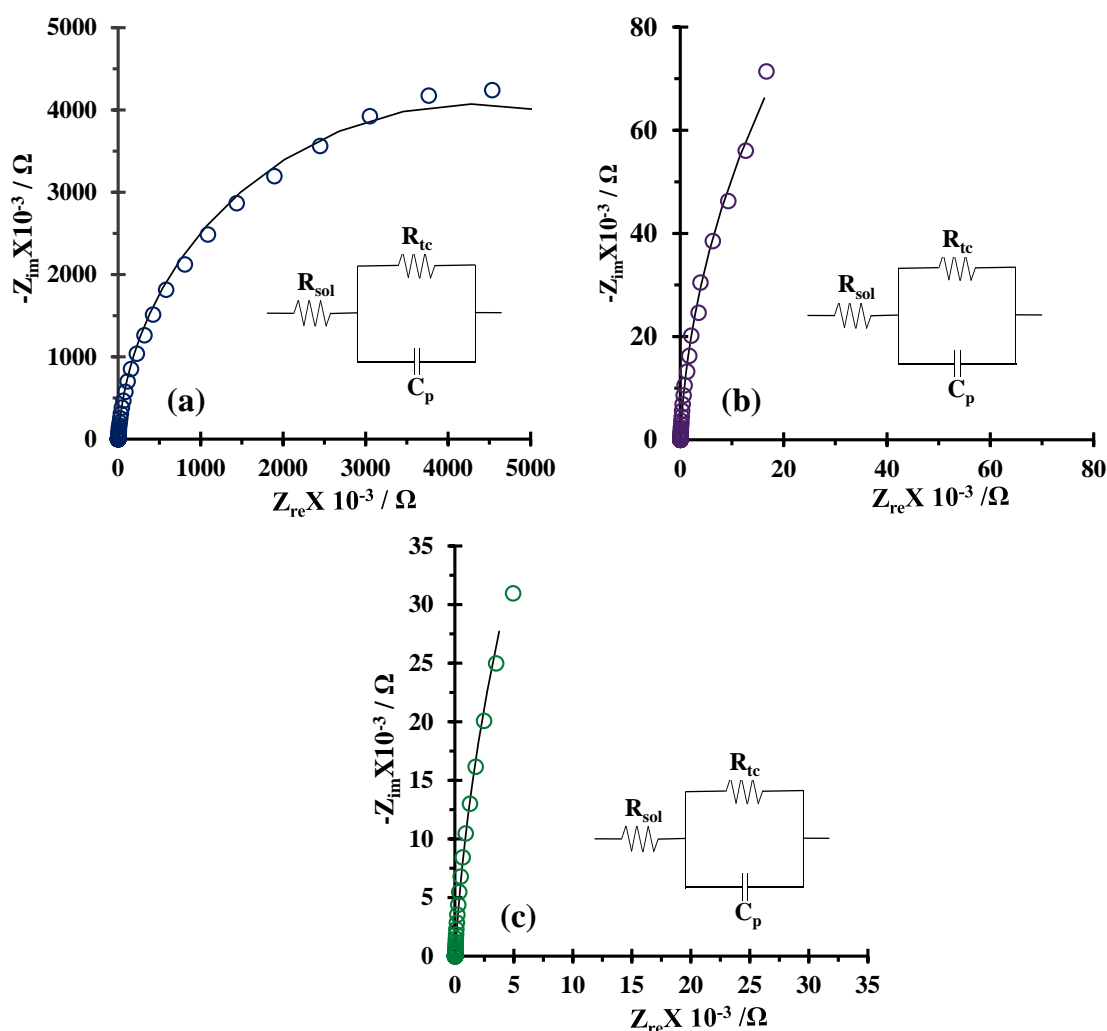


Figura 5.4. Diagramas de Nyquist obtenidos en el sistema: (a) EPC, (b) EPC- β CD₍₂₅ ciclos) y (c) NPsAu• β CD₍₂₅ ciclos) /0.1 M de HClO₄; a un potencial de circuito abierto en un intervalo de frecuencia de 100,000 Hz a 0.01 Hz. Los marcadores muestran los espectros de impedancia experimentalmente y las líneas continuas los teóricos.

En los espectros de la Figura 5.4, se observa que las componentes imaginaria (Z_{im}) y real (Z_{re}) son mayores para el caso donde se utilizó el EPC sin modificar, lo que indica que se tiene una mayor resistencia a la transferencia de carga. Con los datos experimentales de frecuencia, Z_{im} , Z_{re} , el circuito equivalente Randles, y el programa Zview, se calcularon la R_{sol} , la R_{tc} , así como la C_p , los datos se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Resistencia a la solución, transferencia de carga y capacitancia.

Electrodo	$R_{sol} \times 10^6 / \Omega$	$R_{tc} \times 10^6 / \Omega$	$C_p \times 10^4 / F$
EPC	23.43	8.96	0.010
EPC- β CD _(25 ciclos)	26.71	0.35	2.088
EPC-NPsAu• β CD _(25 ciclos)	18.14	0.037	5.098

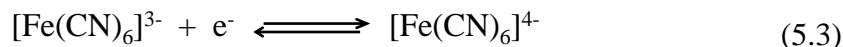
En la Tabla 5.2, se observa un valor de la R_{tc} menor al usar un EPC-NPsAu• β CD_(25 ciclos), lo que indica que la película de NPsAu• β CD mejora la sensibilidad del EPC. En tanto, que la C_p para este caso es mayor; por lo que se deduce que al imponer un potencial hay una acumulación de carga considerable, debido a un área expuesta mayor, de acuerdo con la ecuación (5.2):

$$C_{ap} = \frac{\epsilon_r A}{d} \quad (5.2)$$

donde C_p es la capacitancia, ϵ_r es la constante dieléctrica, A el área expuesta y d el espesor de la película (distancia entre las placas de la doble capa). Mediante un estudio de velocidad usando la técnica de VC, es posible estimar el A de los sensores.

5.2.1.2 Cálculo del área electroactiva

Para calcular A , se realizó un estudio voltamperométrico variando la velocidad de barrido con cada uno de los electrodos, en el sistema modelo de la reducción del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ tal como se reporta en la literatura [4], de acuerdo a la ecuación química (5.3):



En la Figura 5.5, se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en los sistemas: (a) EPC, (b) EPC- $\beta\text{CD}_{(5\text{ ciclos})}$ y (c) EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(5\text{ ciclos})}$ / 0.006 M de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 1 M de KNO_3 , a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 10 a 100 mVs^{-1} , en dirección catódica. Conforme la velocidad de barrido se incrementa la intensidad de corriente del pico de oxidación y reducción aumenta, teniendo para los tres sistemas una diferencia de potencial de aproximadamente 60 mV, que es lo correspondiente para un proceso reversible, según la ecuación de Nernst para la transferencia de un electrón [3].

Al calcular la relación entre las corrientes máximas del pico de oxidación y de reducción, i_{pa}/i_{pc} , se obtuvo un valor de 0.997, 0.994 y 0.997 para el EPC, el EPC- $\beta\text{CD}_{(5\text{ ciclos})}$ y EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(5\text{ ciclos})}$, respectivamente; por lo que resulta indistinto estimar el A con la i_{pa} o la i_{pc} . Con el objeto de saber si el proceso está controlado por la difusión, se construyen las gráficas de la intensidad de corriente vs. la $v^{1/2}$, utilizando la corriente catódica de los VC de la Figura 5.5.

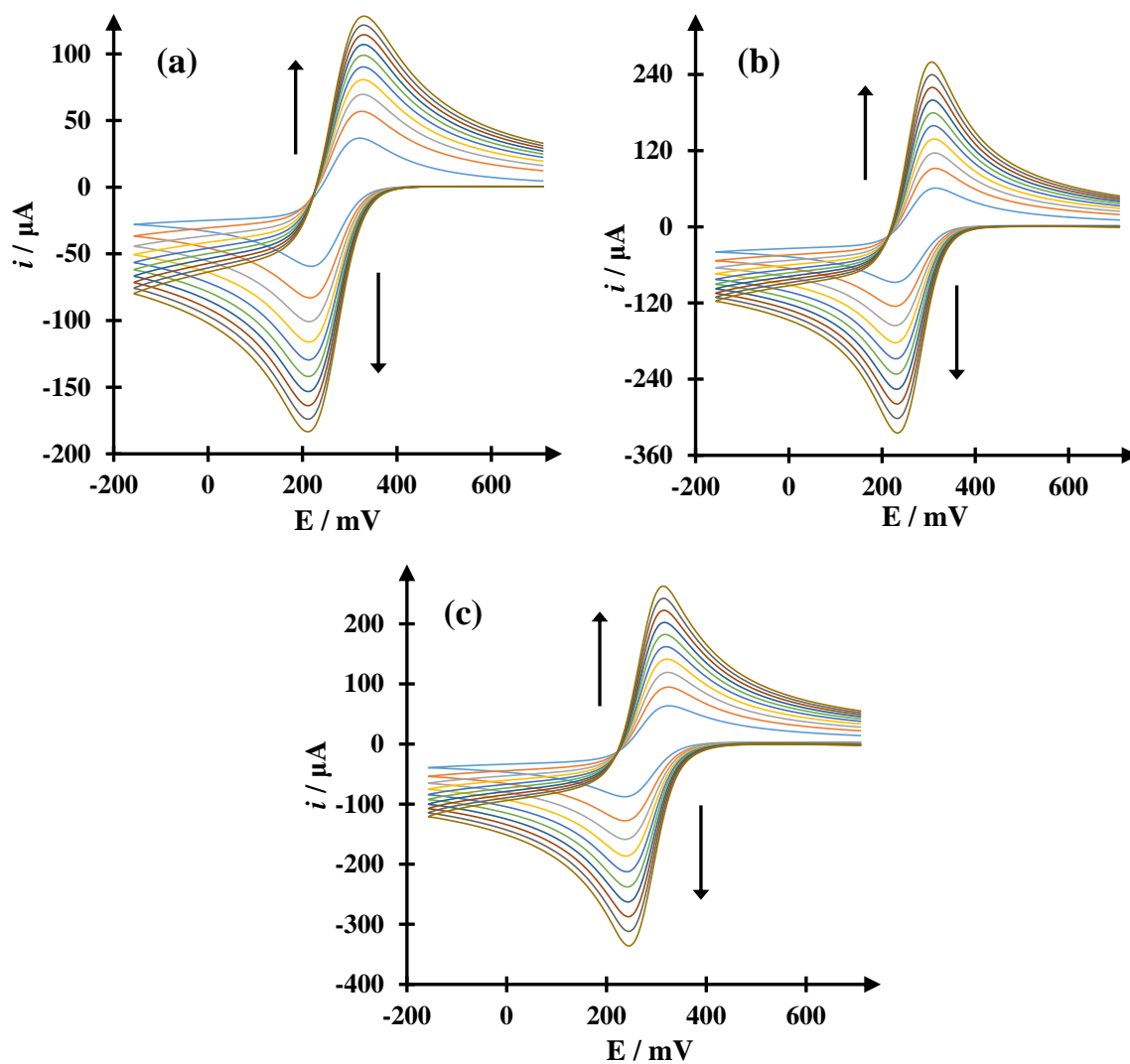


Figura 5.5. Voltamperogramas cíclicos para el sistema (a) EPC, (b) EPC- β CD_(5ciclos) y (c) EPC-NPsAu• β CD_(5ciclos) /0.006 M K₃Fe(CN)₆ en 1 M de KNO₃ a diferentes velocidades de barrido.

En la Figura 5.6, se muestra la tendencia de la i_{pc} en función de la $v^{1/2}$. En los tres sistemas se observa una dependencia lineal, las expresiones matemáticas que describen este comportamiento, así como los R^2 , se dan en la Tabla 5.3.

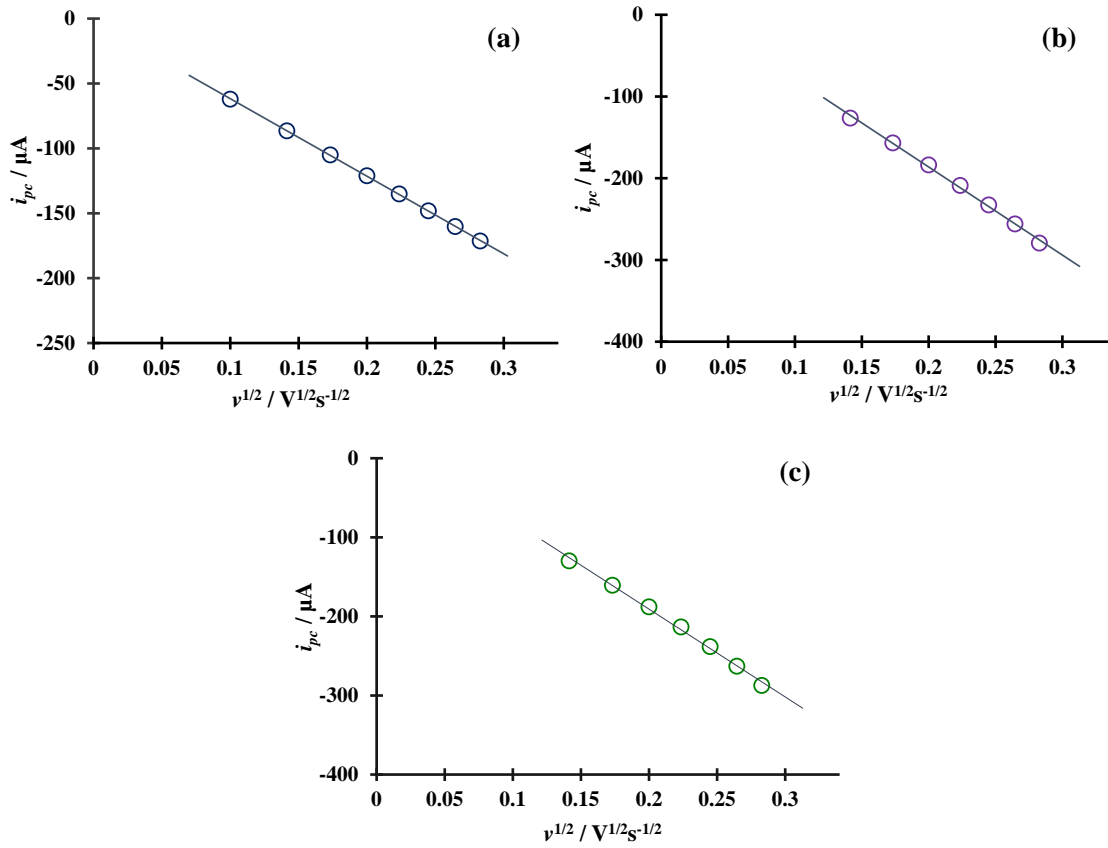


Figura 5.6. Tendencia de la i_{pa} en función de $v^{1/2}$ para los sistemas (a) EPC, (b) EPC/ β CD_(5 ciclos) y (c) EPC/NPsAu• β CD_(5 ciclos).

Tabla 5.3. Ecuaciones de las curvas $i = f(v^{1/2})$.

Electrodo	Ecuación	R ²
EPC	$i_{pa}(\mu A) = -(601.68 \pm 2.54)(\mu A V^{-1/2} s^{1/2})v^{1/2} - (1.21 \pm 0.59)(\mu A)$	0.999
EPC- β CD _(25 ciclos)	$i_{pa}(\mu A) = -(1008.97 \pm 23.94)(\mu A V^{-1/2} s^{1/2})v^{1/2} + (28.65 \pm 4.78)(\mu A)$	0.998
EPC-NPsAu• β CD _(25 ciclos)	$i_{pa}(\mu A) = -(1126.82 \pm 32.31)(\mu A V^{-1/2} s^{1/2})v^{1/2} + (31.39 \pm 7.57)(\mu A)$	0.997

Este comportamiento, indica que el proceso está controlado por la difusión de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik (5.4), ya que la respuesta de la corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, es lineal para un sistema reversible [3,5]:

$$i_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (5.4)$$

donde n es el número de electrones en un mol, A es el área electroactiva del electrodo en cm^2 , C es la concentración en mol/cm^3 , v es la velocidad de barrido del potencial en Vs^{-1} y D es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} , el cual tiene un valor de $7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y de $6.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ [3,6]. Empleando el valor de la pendiente de la curva, así como la ecuación de Randles-Sevcik, fue posible estimar el A para los tres sistemas, los valores se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Áreas electroactivas estimadas para los diferentes electrodos.

Electrodo	A (cm^2)
EPC	0.1385 ± 0.0010
EPC- $\beta\text{CD}_{(5 \text{ ciclos})}$	0.2443 ± 0.0117
EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(5 \text{ ciclos})}$	0.2528 ± 0.0136

En la Tabla 5.4, se observa un valor de A mayor para el EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(5 \text{ ciclos})}$, lo que concuerda con los resultados de la C_p , de estos resultados se deduce que las NPsAu favorece la polimerización de la βCD y por lo tanto el crecimiento de la película.

5.2.2 Caracterización electroquímica de la polimerización de las NPsAu• βCD sobre el EPC

5.2.2.1 Modificación electroquímica del EPC con NPsAu• βCD

Con la finalidad de analizar a detalle la polimerización de las NPsAu• βCD , en la Figura 5.7, se muestran los voltamperogramas cíclicos del sistema EPC/NPsAu• βCD en 1 M de HClO_4 ; obtenidos al aplicar 25 ciclos sucesivos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} . El voltamperograma del segundo ciclo presenta un pico de oxidación en 400 mV (a), al invertir el barrido de potencial se registra un pico de reducción -357 mV (b); conforme el número de ciclos aumenta se observan dos hombros en la zona anódica (c) y (d) a 818 y 1050 mV y uno en la zona catódica (e) en 655 mV. El aumento en la intensidad de corriente en función al número de ciclos indica, que la especie electroactiva se está depositando en la superficie del EPC. Este comportamiento, es el mismo que presenta la polimerización de la βCD sobre un

EPC, en donde el pico (a) y (b) corresponde al proceso redox de la β CD, mientras que los picos (c), (d) y (e) a los procesos de adsorción [1].

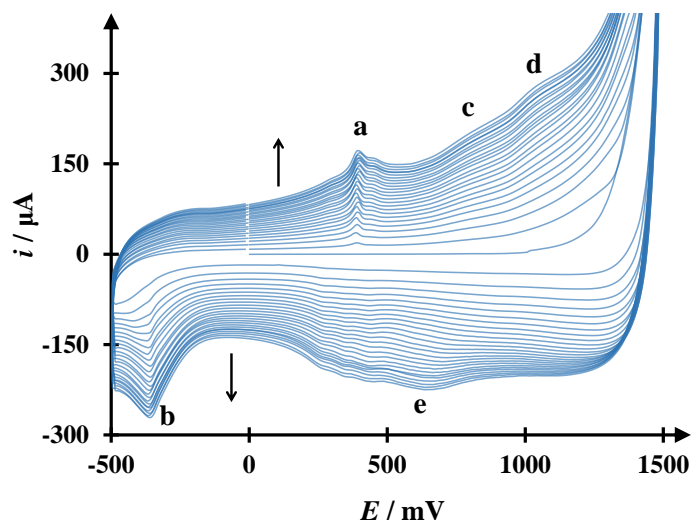


Figura 5.7. Voltamperogramas cíclicos de la polimerización de NPsAu• β CD en el sistema EPC/ NPsAu sintetizadas con 0.007 M de β CD en 1 M de HClO_4 (pH 0), a una velocidad de 100 mVs^{-1} , 25 ciclos.

Para conocer la contribución de la NPsAu, en la Figura 5.8(a) se presenta la polimerización del sistema EPC/ 0.007 M de β CD en 1 M de HClO_4 a 25 ciclos y una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} (línea roja); esta respuesta se compara con la obtenida para las NPsAu• β CD a las mismas condiciones (línea azul). Los CV obtenidos para el sistema de las NPsAu• β CD, muestran una intensidad de corriente mayor que los del sistema de la β CD, lo cual indica que se tiene una mayor carga en presencia de las NPsAu.

En la Figura 5.8(b), se grafica la variación de la carga anódica, Q_a , en función del número de ciclos para el sistema β CD y NPsAu• β CD, obtenidas a partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 5.7. En ambos sistemas, se observa claramente el incremento de las cargas en función del número de ciclos, siendo mayor para las NPsAu• β CD. Además, se aprecian dos regiones lineales para β CD y tres en el caso de las NPsAu• β CD como se mencionó en el Capítulo 4, las cuales se asocian a las etapas de la modificación del EPC. Roa *et al.* [1], asocian la primera etapa a la adsorción de β CD sobre el EPC, la cual se debe a las interacciones de los radicales libres que se adhirieron a la superficie del EPC y que son

generados por la oxidación de los OH primarios de la β CD. Entre tanto, la segunda etapa se debe a la formación de los oligómeros, donde los OH se oxidan generando un aldehído y / o un ácido carboxílico, el cual reacciona con otras moléculas de β CD y forman dímeros con la liberación de agua, los cuales a su vez reaccionan con otras moléculas de β CD para formar una capa electroactiva del polímero. Estas dos etapas están presentes en la polimerización con $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$, sin embargo se presenta un mayor crecimiento del polímero aplicando el mismo número de ciclos, la tercer etapa es debido a un cambio en el crecimiento de la película.

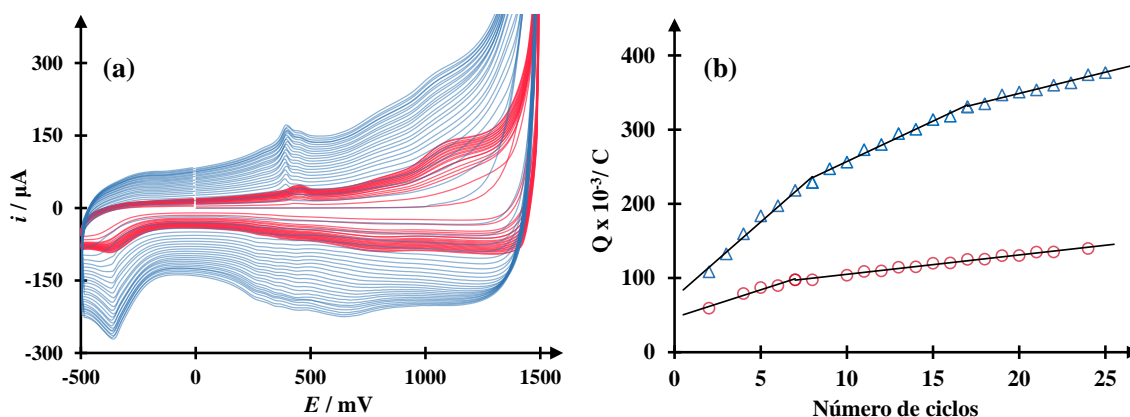


Figura 5.8. (a) Comparación de los voltamperogramas cíclicos, obtenidos al aplicar 25 ciclos en los sistema: EPC/ 1 M de HClO_4 , 0.007 M de βCD (—) sin y (—) con NPsAu a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , (b) Gráfica de la tendencia de las Q en función del número de ciclos crecidos de βCD (○) y $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ (Δ) sobre el EPC.

Conocer el efecto que tienen algunos parámetros experimentales sobre la polimerización de las $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ en EPC, podría permitir tener el control del crecimiento de la película sobre el EPC para la detección de una especie electroactiva determinada. Por esta razón, se varió el número de ciclos, ventana de potencial y concentración de HClO_4 .

5.2.2.2 Efecto del número de ciclos

Para conocer el efecto del número de ciclos en la polimerización de las $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ sobre el EPC, se propone el crecimiento a 5, 15 y 25 ciclos en el sistema EPC/ NPsAu con 0.007 M

de β CD en 1M de HClO_4 . En la Figura 5.9(a), se muestra el último ciclo obtenido para cada sistema: I (5), II (15) y III (25), en donde se aprecia un incremento de la corriente al aumenta el número de ciclos. En la Figura 5.9(b) se presenta la variación de las cargas anódicas y catódicas en función del número de ciclos para cada sistema (5, 15 y 25 ciclos), en la cual se observa un aumento de las cargas en función del número de ciclos.

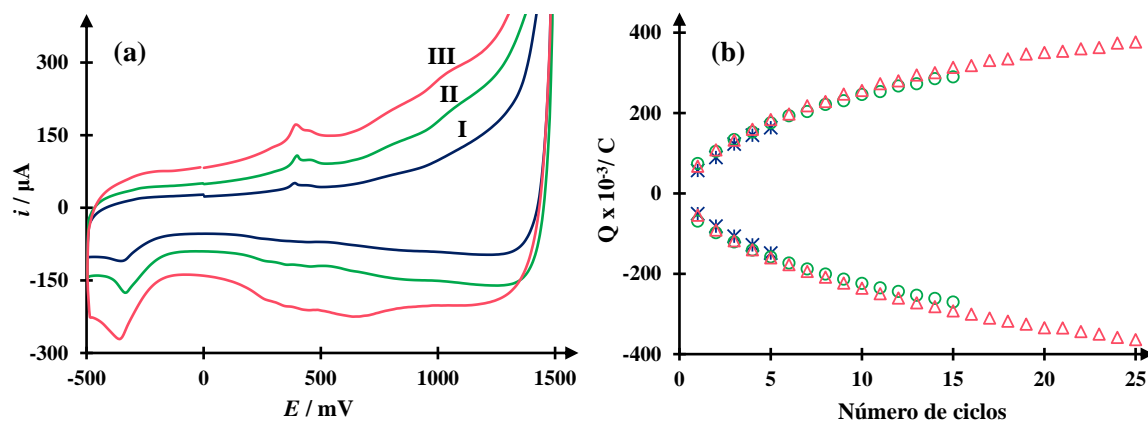


Figura 5.9. (a) Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la polimerización de $\text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$ en el sistema $\text{EPC} / \text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$ en 1 M de HClO_4 (pH 0), a una velocidad de 100 mVs^{-1} , al aplicar: (I) 5, (II) 15 y (III) 25 ciclos. (b) Gráfica de las cargas en función del número de ciclos al aplicar 5 (\times), 15 (\circ) y 25 (Δ) ciclos.

5.2.2.3 Efecto de la ventana de potencial

Se realizan las polimerizaciones del sistema $\text{EPC} / \text{NPsAu} \cdot \beta\text{CD}$ en 1 M de HClO_4 , aplicando 25 ciclos a 100 mVs^{-1} , a diferentes ventanas de potencial de inversión 1200 (I), 1300 (II), 1400 (III) y (IV) 1500 mV. La Figura 5.10, sólo muestra el último voltamperogramas cíclico para cada polimerización. Al aplicar un potencial de inversión de 1200 mV (I), no observa ninguna señal electroquímica y no se registra crecimiento del polímero durante el barrido de potencial; fijando el potencial de inversión de 1300 mV (II) se advierte el pico (c) de la Figura 5.7, sin embargo aún no se presenta un mayor crecimiento del polímero, debido a que se requiere un potencial anódico de mayor energía para oxidar parcialmente la βCD [1]. Al seguir aumentando el potencial de inversión se observa la aparición del pico de oxidación (a) y reducción (b) (Figura 5.7), los cuales se asocian con el crecimiento del polímero, siendo

mayor para el potencial de inversión de 1500 mV (IV). Estos resultados demuestran, que el proceso de adsorción y de crecimiento del polímero sobre el EPC se ve favorecido al aplicar un potencial de inversión mayor.

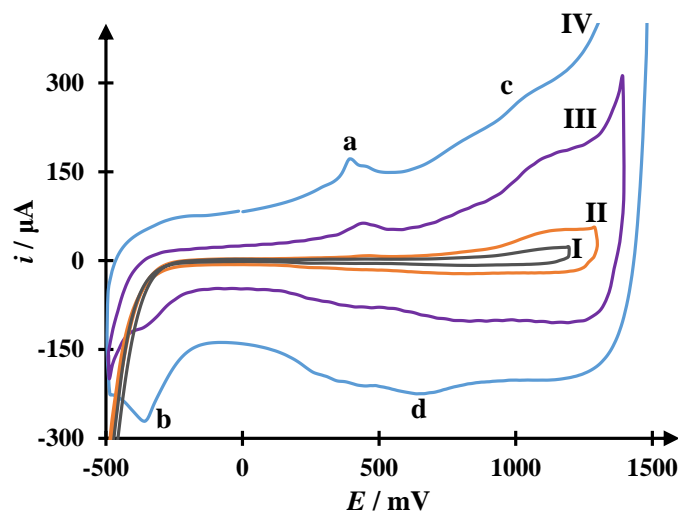


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos de la polimerización de NPsAu•βCD aplicando 25 ciclos, para el sistema EPC/ NPsAu•βCD en 1 M de HClO₄ a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹ al variar el potencial de inversión: (I) 1200, (II) 1300, (III) 1400 y (IV) 1500 mV.

5.2.2.4 Efecto de la concentración del HClO₄

En la Figura 5.11, se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos al aplicar 25 ciclos en el sistema EPC/NPsAu con 0.007 M de βCD a diferentes concentraciones de HClO₄ (0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 M). Para los sistemas con 0.1 y 0.5 M de HClO₄ no se aprecian los picos característicos de oxidación y reducción, mientras que a una concentración 1 M de HClO₄ ya se aprecian dichos picos (a), (b) (c) y (d) asociados con el crecimiento del polímero. Estos resultados indican que la concentración de protones en el sistema favorecen la formación del polímero, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Corona *et al.* [2], para la βCD. Entonces, al aumentar la concentración de H⁺ los grupos primarios OH de la βCD son más susceptibles a la oxidación y como ya se había mencionado, dan lugar a la formación de aldehídos y / o un ácido carboxílicos, que forman dímeros y polimerizan al reaccionar con otras moléculas de βCD cuando se aplican *n* ciclos de barrido de potencial.

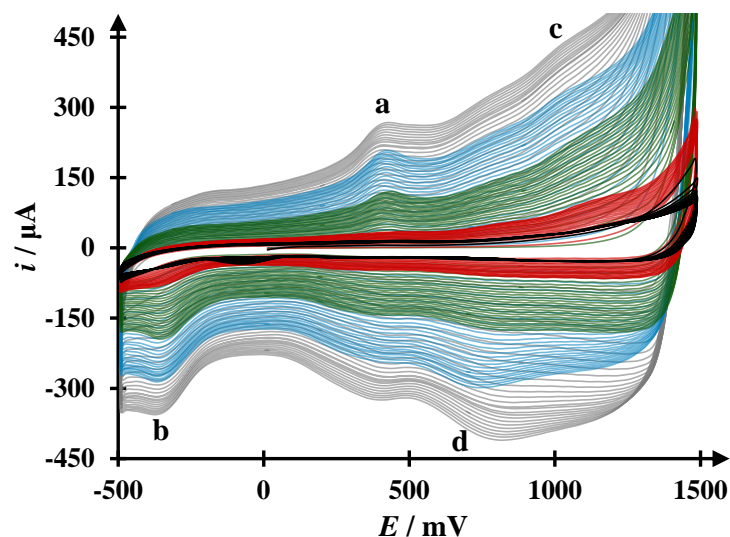


Figura 5.11. Voltamperogramas cíclicos de la polimerización de NPsAu•βCD aplicando 25 ciclos, para el sistema EPC/NPsAu con 0.007 M de βCD, a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹, variando la concentración de HClO₄: (—) 0.1, (—) 0.5, (—) 1, (—) 1.5 y (—) 2 M.

5.3 Conclusiones

El aumento de la capacitancia al modificar la superficie del EPC, indica la formación de una película, así como el aumento del área superficial del electrodo. Los resultados de la capacitancia muestran una magnitud mayor para el EPC modificado con NPsAu•βCD, lo cual concuerda con el cálculo del área electroactiva usando el sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Además, el valor de la resistencia de la transferencia de carga, señala que la película de NPsAu•βCD mejora la sensibilidad del electrodo.

La polimerización de las NPsAu•βCD, muestra la formación de una película que presenta el mismo comportamiento de la βCD. Al estudiar la influencia de los diferentes factores que afectan la polimerización de las NPsAu•βCD, se encuentra que el proceso de adsorción y de propagación del polímero sobre el EPC, se ve favorecido al aumentar el número de ciclos aplicados, así como a un potencial de inversión mayor y al aumentar la concentración de protones.

5.4 Referencias

- [1] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.
- [2] S. Corona-Avendaño, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, A. Rojas-Hernández, M. Palomar-Pardavé, Influence of the HClO₄ concentration on the β -CD electropolymerization over a carbon paste electrode and on dopamine's electrochemical response, *Electrochim. Acta.* 89 (2013) 854–860.
- [3] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, 2da. edici, JOHN WILEY & SONS, IN, United States of America, 2001.
- [4] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 702–706.
- [5] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edit, John Wiley & Sons, 2006.
- [6] D.K. Grosser, *Cyclic Voltammetry, Simulation and analysis of reaction mechanisms*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, I, VCH Publishers, 1994.

Capítulo 6. Caracterización electroquímica de la Melatonina empleando un EPC

Antes de realizar los estudios para la determinación electroquímica de la MT, es importante conocer su comportamiento electroquímico. Es por ello, que este Capítulo se centra en el estudio de los procesos redox correspondientes a las señales electroquímicas que presenta la MT sobre un EPC al emplear la técnica de voltamperometría cíclica. En base al mecanismo propuesto por Radi *et al.* [1], fue posible plantear los procesos de oxidación de la MT y proponer el proceso de reducción asociada a la señal catódica. Además, usando la técnica de VC, se estudia el efecto de la velocidad de barrido sobre el comportamiento redox de la MT y con el objeto de saber si éste se ve afectado por la posible formación de subproductos, los estudios se hicieron renovando y sin renovar la superficie del EPC.

Por otro lado, también es importante conocer algunos parámetros electroquímicos de la MT como el número de electrones, n ; que se pierden durante el proceso de oxidación, el cual ya sido reportado. Radi *et al.* [1], encontraron que n transferidos involucrados en la oxidación de la MT es el doble del número de protones que se pierden ($-2e^-$ y $-1H^+$), al estudiar el efecto del pH en el comportamiento electroquímico de la MT y analizar la variación del E vs. pH. Posteriormente, varios autores estimaron $2e^-$ y $1H^+$ involucrados en la oxidación de la MT al utilizar la misma técnica [2–8]. Más recientemente Apetrei *et al.* [9] y Smajor *et al.* [7], encontraron que $n = 1$ para el primer proceso de oxidación de la MT, a partir de la variación del E en función del logaritmo natural de la velocidad de barrido. Para tener un dato confiable, en este Capítulo se calculó n mediante dos métodos experimentales que no se han reportado hasta el momento en la literatura, para este cálculo. El primer cálculo se hizo a partir la variación de E vs. $\log v$ obtenida de los voltamperogramas de corriente muestreada a diferentes tiempos de un estudio cronoamperométrico y empleando la ecuación de Nernst para procesos controlados por la transferencia de masa [10]. Mientras que el segundo cálculo, se hizo a partir de un estudio voltamperométrico diferencial de pulso variando la amplitud de pulso y considerando los criterios propuestos por Parry y Osteryoung [11] y Brett y Brett [12], lo que corroboró que $n = 1$.

Otro parámetro electroquímico importante es el coeficiente de difusión, D ; el cual a la fecha únicamente se ha reportado en el trabajo de Gómez *et al.* [6] con un valor de $7.50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para la MT, no obstante en este cálculo se utilizó $n = 2$, lo cual es erróneo de acuerdo a lo encontrado en este trabajo. Es por ello, que en este Capítulo también se calcula el D para la MT, usando distintos métodos. Para la primera estimación se utiliza la técnica de VC variando la velocidad de barrido en condiciones estáticas y empleando la ecuación de Randles-Sevcik [13]. También fue posible calcular D , usando la técnica de cronoamperometría en condiciones estáticas, así como la ecuación de Cottrell [10]. Finalmente, mediante la técnica de voltamperometría lineal de disco rotatorio, VLDR, en condiciones de convección forzada y usando la ecuación de Levich [10], se hizo un cálculo más exacto del D , ya que a partir de esta técnica el proceso que ocurre en la superficie del electrodo está controlado únicamente por el transporte de masa, además de que la ecuación de Levich toma en cuenta la influencia del medio.

6.1 Metodología

6.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se preparan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con agua burbujeada con N_2 . Durante los experimentos se mantuvo una temperatura de 25°C y una atmósfera inerte, evitando el contacto con el oxígeno. Los reactivos son los siguientes: MT (Sigma-Aldrich 98%). HClO_4 (Sigma-Aldrich 70 %), grafito en polvo (AlfaAesar 99.9995%) y aceite mineral (Fluka).

6.1.2 Instrumentación

Se utilizan un potenciostato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100 y un potenciostato-galvanostato marca EPSILON, a los cual se conecta una celda típica de tres electrodos, como contraelectrodo un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo

un EPC de 4.4 o 3 mm de diámetro. Para los experimentos en condiciones de convección forzada, el EPC se acopla a un controlador de electrodo de disco rotatorio (RDE-BAS-2). Los EPC, se preparan siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al* [14].

6.2 Resultados

6.2.1 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC

En la Figura 6.1 se muestra el voltamperograma cíclico del sistema: EPC / 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . El barrido se realizó en sentido positivo, tal como lo indica el sentido de las flechas. En el VC se observan dos picos de oxidación a un potencial, E_{pa} , de 812 mV (I) y 998 mV (II), al invertir el barrido de potencial se registra un pico de reducción a un potencial, E_{pc} , de 42 mV (III).

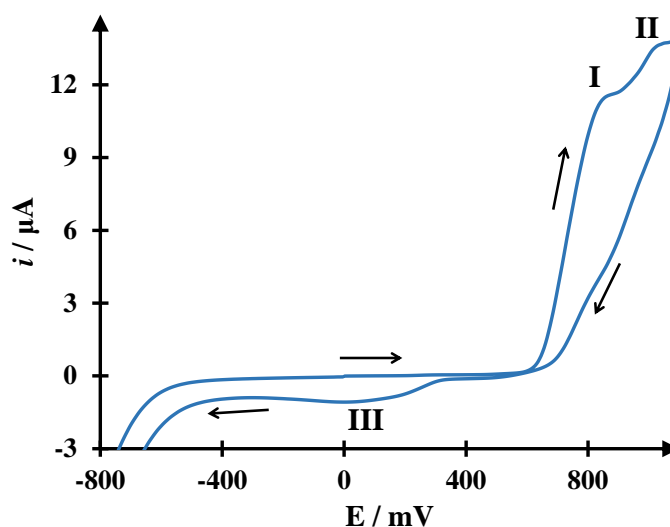


Figura 6.1. Voltamperograma cíclico para el sistema EPC /0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) velocidad de barrido de 20 mV s^{-1} .

La oxidación de la MT es un proceso complejo, donde es posible la formación de distintas especies, obtenidas mediante diferentes reacciones redox y reacciones químicas acopladas. A pesar de estas dificultades, en la literatura se propone un mecanismo donde la oxidación de la MT se da en dos pasos, los cuales corresponden a los dos picos de oxidación I y II, como se muestra en el esquema de la Figura 6.2. El primer proceso de oxidación I involucra

la transferencia de un electrón ($-1e^-$) que genera un radical catión, en el segundo proceso II el radical catión se oxida por la pérdida de un segundo electrón y protón ($-1e^-$ y $-1H^+$) en una quinonaimina muy reactiva, la cual es susceptible de un ataque nucleofílico [1,15]. El pico de reducción III que se observa, probablemente corresponde a la reducción de los productos de oxidación de la melatonina del primer o segundo proceso de reducción.

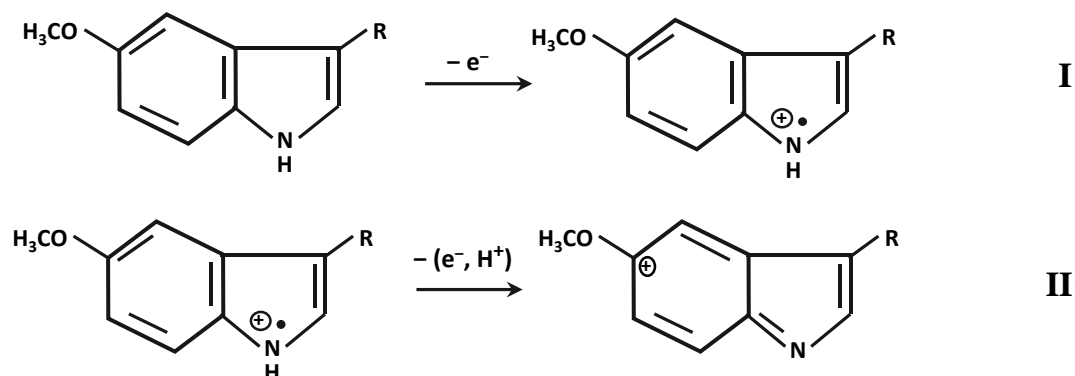


Figura 6.2. Esquema de los procesos de oxidación de la MT, correspondientes a los picos anódicos I y II, en donde $R = CH_2CH_2NHCOCH_3$ [1].

Para conocer si el proceso de oxidación I corresponde el pico de reducción III se lleva a cabo un estudio de inversión de potencial. En la Figura 6.3 se presentan los voltamperogramas cíclicos, obtenidos en una disolución 0.2 mM de MT en 0.001 M $HClO_4$ (pH 3), a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} , variando el potencial de inversión, E_λ , de -500 a 1000 mV. Con la finalidad de observar únicamente los procesos electroquímicos de la MT, antes de cada experimento, se renovó la superficie del electrodo. En la Figura 6.3(a), al incrementar el potencial de inversión, se observa la aparición del pico de reducción III a medida que se perfila el pico de oxidación I. En la Figura 6.3(b), al seguir aumentando el potencial de inversión aparece el pico de oxidación II, sin embargo el pico de reducción III ya no aumenta. Esto podría indicar, que el pico de reducción III corresponde al pico de oxidación I, y la reacción de reducción se puede plantear como se muestra en el esquema de la Figura 6.4.

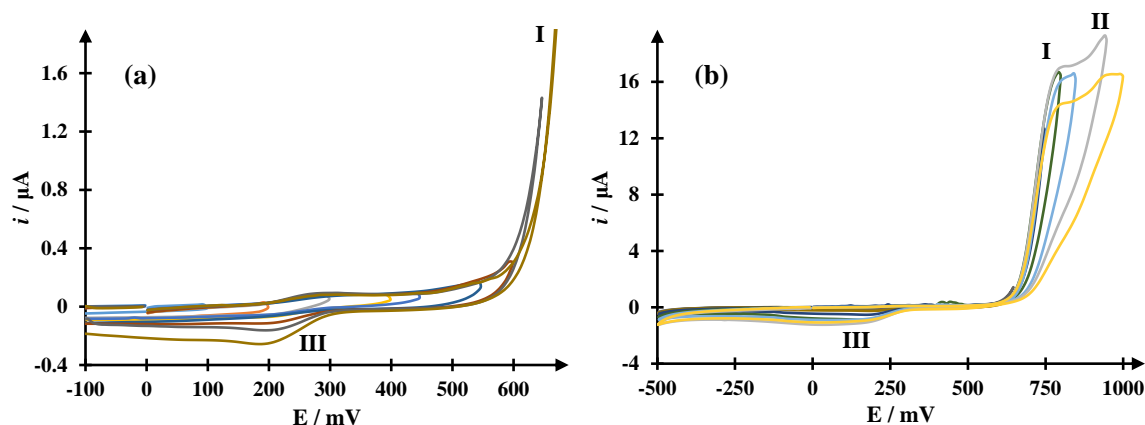


Figura 6.3. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} ; obtenidos en un intervalo de E_L de (a) 100 a 700 mV y de (b) 100 a 1000 mV.

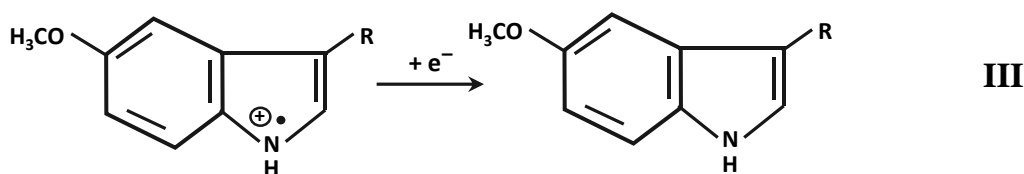


Figura 6.4. Esquema del proceso de reducción, correspondiente al pico catódico III, propuesto a partir del estudio de inversión ($\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$).

Para seguir analizando los procesos redox de la MT, se aplica un segundo ciclo de barrido. En la Figura 6.5, se comparan el primer (línea continua) y segundo (línea discontinua) voltamperograma cíclico obtenidos consecutivamente en el sistema: EPC / 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 a 20 mVs^{-1} . En el segundo voltamperograma cíclico, se observan los mismos picos de oxidación y reducción del primer ciclo (I, II y III), además de un pico de oxidación IV en un potencial de 372 mV. En la literatura, se plantea que el pico IV corresponde a la oxidación de un derivado indólico 4,5-dihidróxido, que pierde dos protones y dos electrones ($-2e^-$ y -2H^+), dando como producto una quinona muy estable [1,15]. De acuerdo con Radi *et al.* [1] y Corujo *et al.* [15], el derivado indólico 4,5-dihidróxido, se forma a partir de una reacción química acoplada al sistema, cuando la quinonaimina reacciona con dos moléculas de H_2O y pierde un protón ($-\text{H}^+$); el mecanismo propuesto para la reacción

química acoplada, así como de la reacción de oxidación correspondiente al pico anódico IV, se muestra en la Figura 6.6 [1,15].

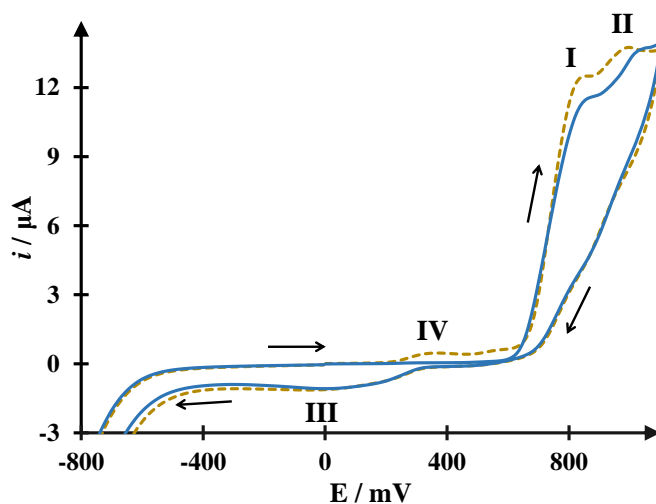


Figura 6.5. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / 0.2 mM MT en 0.001M de HClO_4 (pH 3), a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . La Figura muestra el primer (—) y segundo (---) ciclo obtenidos consecutivamente.

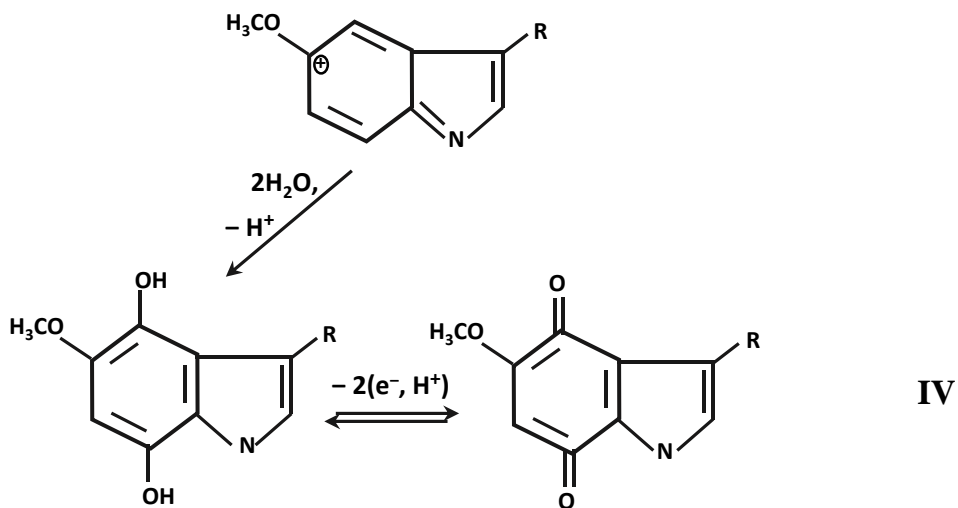


Figura 6.6. Esquema de la reacción química acoplada y del proceso de oxidación asociado al pico anódico IV, donde la quinonaimina forma un derivado indólico 4,5-dihidróxido, que se oxida al imponer un potencial ($\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$) [1,15].

El análisis de las diferentes reacciones redox asociadas a los picos del voltamperograma cíclico, así como de la reacción química acoplada de la MT, corroboran que el proceso es Electroquímico-Químico-Electroquímico, EQE, tal como se propone en la literatura

6.2.2 Estudio de voltamperometría cíclica de la MT sobre un EPC renovando y sin renovar la superficie

Con la finalidad de conocer más del comportamiento electroquímico de la MT, se analiza el efecto de la variación de la velocidad de barrido mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Para poder observar, si los procesos oxidación se ven afectados por la formación del subproducto (derivado indólico 4,5-dihidróxido), el estudio de variación de la velocidad de barrido se hace renovando y sin renovar la superficie del electrodo. En la Figura 6.7 se muestran los voltamperogramas cíclicos, para el sistema EPC/0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a diferentes velocidad de barrido; renovando (a) y sin renovar (b) la superficie del EPC antes de cada medición. En ambos casos, los VC muestran los picos de oxidación I y II, los cuales se desplazan ligeramente hacia potenciales mayores conforme la velocidad de barrido se incrementa. Al invertir el barrido de potencial los VC registran el pico de reducción III, que se mantiene prácticamente constante al aumenta la velocidad de barrido cuando se renueva la superficie del electrodo; sin embargo este pico se desplaza hacia potenciales menores cuando no se renueva la superficie del electrodo. Probablemente este desplazamiento, se deba a la aparición de un segundo pico de reducción acoplado a la oxidación del derivado indólico 4,5-dihidróxido, que se traslapa con el pico III. Los VC obtenidos con el EPC sin renovar la superficie, a partir de 40 mVs^{-1} , también presentan el pico IV asociado a la oxidación del subproducto, el cual se desplaza ligeramente hacia potenciales mayores conforme aumenta la velocidad de barrido. En general, la intensidad de corriente de los picos se incrementa al aumentar la velocidad de barrido.

Con el objeto de observar con mayor claridad las diferencias de ambos estudios voltamperométricos variando la velocidad de barrido, se grafican los voltamperogramas cíclicos obtenidos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} para ambos casos (Figura 6.8). En el VC obtenido con el EPC sin renovar la superficie, se observa la aparición del pico de

oxidación IV, el aumento del pico de oxidación II y un pequeño desplazamiento del pico de reducción III, efectos que se deben probablemente a la formación de subproductos de la oxidación de la MT. Sin embargo, el pico de oxidación I se mantiene casi constante, lo que indica que la primera oxidación de la MT (Figura 6.2, Esquema I) no se ve afectada a pesar de la formación de los subproductos en la interface electrodo-electrolito, cuando se usa el EPC para hacer varias mediciones sin renovar la superficie.

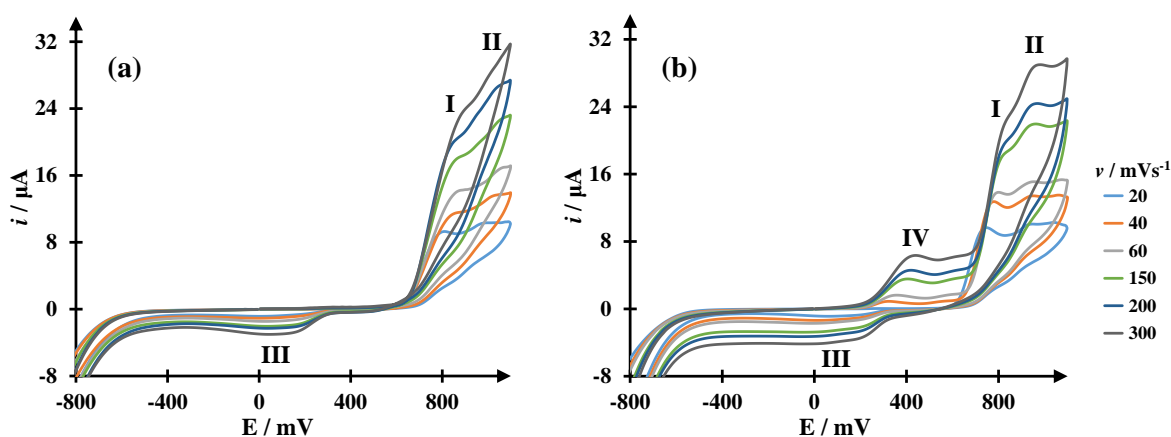


Figura 6.7. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC/ 0.2 mM MT en 0.001M de HClO_4 (pH 3) a diferentes velocidades de barrido: (a) renovando y (b) sin renovar su superficie antes de cada medición.

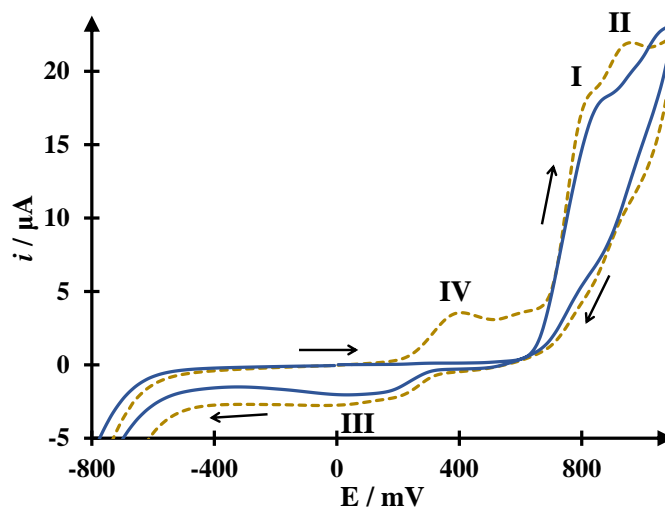


Figura 6.8. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / 0.2 mM MT en 0.001M de HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} , donde el electrodo se usa: renovando (—) y sin renovar (---) su superficie antes de la medición.

En la Figura 6.9 se muestra la gráfica de la i_{pa} en función de la $v^{1/2}$ para los estudios de variación de la velocidad de barrido de la Figura 6.7(a) y (b); donde la corriente del pico anódico corresponde al proceso de oxidación I de la MT. En ambos casos, la i_{pa} presenta una dependencia lineal con respecto a la $v^{1/2}$, a pesar de los procesos de degradación que se llevan a cabo al usar el electrodo sin renovar su superficie. Las expresiones matemáticas que describen este comportamiento para los estudios de variación de la velocidad de barrido renovando y sin renovar la superficie del electrodo, están dadas por:

$$i_{pa}(\mu A) = (1.088 \pm 0.043)(\mu A \text{ mV}^{-1/2} \text{ s}^{1/2})v^{1/2} + (4.725 \pm 0.488)(\mu A) \quad (6.1)$$

y

$$i_{pa}(\mu A) = (0.967 \pm 0.043)(\mu A \text{ mV}^{-1/2} \text{ s}^{1/2})v^{1/2} + (5.858 \pm 0.486)(\mu A) \quad (6.2)$$

con un coeficiente de correlación, R^2 , de 0.994 y 0.992, respectivamente.

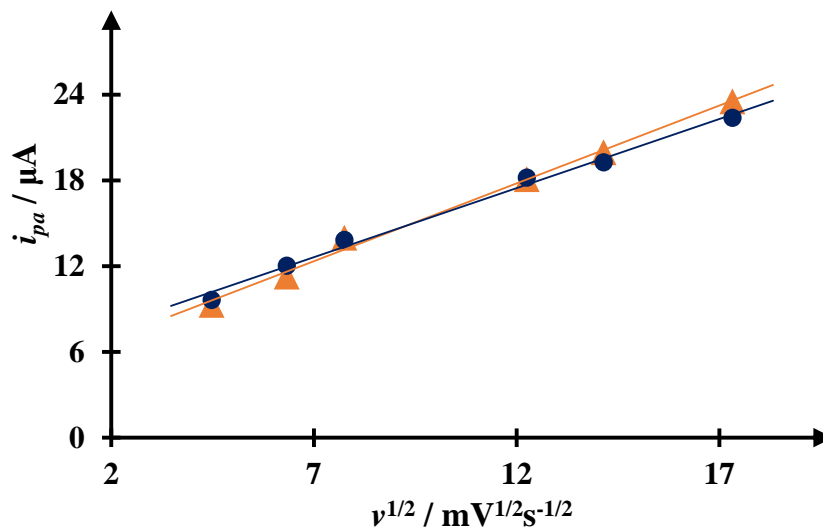


Figura 6.9. Tendencia de la i_{pa} en función de $v^{1/2}$ para el pico anódico correspondiente a la oxidación I de la MT, usando un EPC: renovando (\blacktriangle) y sin renovar (\bullet) la superficie, las líneas continua muestra el ajuste lineal de los datos experimentales.

La relación lineal entre la i_{pa} y la $v^{1/2}$, de acuerdo a la ecuación (6.3) para procesos irreversibles y cuasi-reversibles, indica que el proceso electroquímico de la MT está controlado por la difusión, dicha ecuación es la siguiente:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (6.3)$$

donde n es el número de electrones, A es el área electroactiva del electrodo en cm^2 , C es la concentración en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$, v es la velocidad de barrido del potencial en Vs^{-1} , D es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} , α es el coeficiente de transferencia y n_a es el número de electrones involucrados en la transferencia de carga [13].

6.2.3 Cálculo del coeficiente de difusión en condiciones estáticas

6.2.3.1 Estudio de voltamperometría cíclica

Con el objetivo de estimar el coeficiente de difusión, D , del proceso de oxidación I de la MT, se hace un estudio voltamperométrico variando la velocidad de barrido en condiciones estáticas, para observar únicamente este proceso se acota la ventana de potencial de 400 a 900 mV. Para obtener una aproximación más exacta del D se aplican velocidades de barrido pequeñas y se renueva la superficie del electrodo antes de cada medición, además se mantiene una temperatura constante de 25°C y una atmósfera de N_2 . La Figura 6.10 muestra los voltamperogramas obtenidos para el sistema: EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), aplicando diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 5 a 65 mVs^{-1} . Los voltamperogramas obtenidos a bajas velocidades de barrido, presentan un pico de oxidación en 749 mV, correspondiente a la oxidación de la MT. Conforme la velocidad de barrido se incrementa, el pico se desplaza ligeramente hacia potenciales más positivos, 788m V y la corriente aumenta.

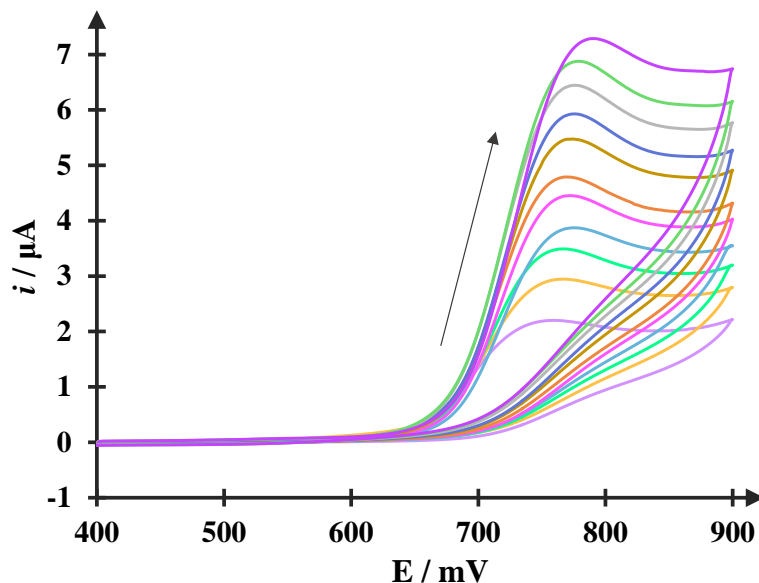


Figura 6.10. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a diferentes velocidades de barrido ($5 - 65 \text{ mVs}^{-1}$).

En la Figura 6.11 se presenta la variación de la intensidad de la i_{pa} en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, $v^{1/2}$, donde puede observarse que la i_{pa} muestra una dependencia lineal con respecto a la $v^{1/2}$, la ecuación matemática que describe este comportamiento es:

$$i_{pa}(\mu A) = (0.808 \pm 0.009)(\mu A \text{ mV}^{-1/2} \text{ s}^{1/2})v^{1/2} + (0.372 \pm 0.059)(A\mu) \quad (6.4)$$

donde R^2 es 0.999.

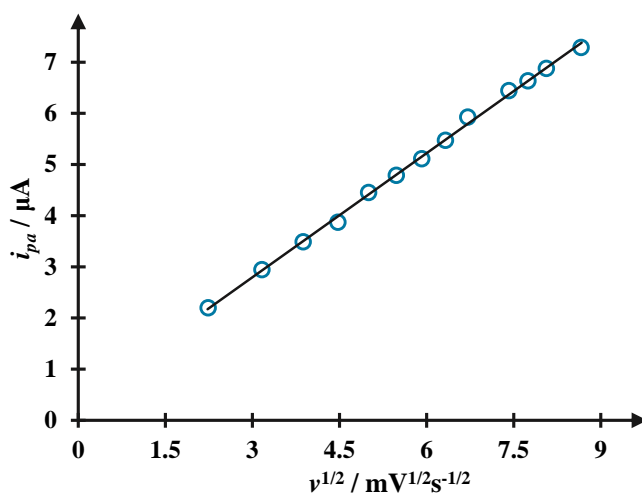


Figura 6.11. Variación de la i_{ap} en función de $v^{1/2}$, obtenida de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 6.10.

La relación lineal entre la i_{pa} y la $v^{1/2}$, como ya se ha mencionado indica que el proceso de oxidación de la MT está controlado por la difusión. Por otro lado, debido a que el estudio se efectúa a velocidades bajas y a una temperatura constante de 25°C, es posible utilizar la ecuación de Randles–Sevcik (6.5) para hacer una aproximación del valor del D [13]:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (6.5)$$

Para poder obtener el valor de D , se estima A del EPC empleando un sistema modelo de la reducción del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Mediante la técnica de voltamperometría cíclica se hace un estudio de variación de velocidad de barrido para el sistema EPC/6 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 1 M de KNO_3 [10]; a partir de la pendiente de la gráfica i_{pa} vs. $v^{1/2}$ y la ecuación de Randles y Sevcik (6.4), se calcula A obteniendo un valor de $(7.413 \pm 0.053) \times 10^{-2} \text{ cm}^2$, procedimiento descrito más detalladamente en el Capítulo 5.

Con el valor del A , tomado $n = 1$ como lo propuso Radi *et al.* [1] y más reciente Levent *et al.* [3] y utilizando la ecuación de Randles y Sevcik (1), así como el valor de la pendiente $8084 \pm 009 \mu\text{AmV}^{-1/2}\text{s}^{1/2}$ de la ecuación (6.4) correspondiente a la gráfica i_{pa} vs. $v^{1/2}$ de la Figura 6.11, se estima el D obteniendo un valor de $(4.54 \pm 0.21) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, del mismo orden del reportado por Gomez *et al.* [6].

6.2.3.2 Estudio cronoamperométrico

Otra forma de estimar D , es mediante un estudio cronoamperométrico en condiciones estáticas y la ecuación de Cottrell (6.7), que describe la dependencia del i en función del $t^{-1/2}$ para procesos controlados por la difusión:

$$i = n F A C D^{1/2} \pi^{-1/2} t^{-1/2} \quad (6.7)$$

donde n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, A es el área electroactiva del electrodo en cm^2 , C es la concentración en mol/cm^3 , D es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} y t el tiempo en s [10]. La Figura 6.12, presenta la familia de transitorios obtenidos en el sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), obtenidos al aplicar diferentes potenciales en un intervalo de 605 a 855 mV y renovando la superficie del electrodo antes de cada medición. Durante los experimentos se mantuvo una temperatura

constante de 25°C y una atmósfera inerte. Los cronoamperogramas muestran una corriente máxima a tiempos cercanos a cero, la cual disminuye y tiende a estabilizarse al transcurrir el tiempo. Al incrementar el potencial impuesto, la corriente de los cronoamperogramas aumenta. El inserto de la Figura 6.12, muestra el gráfico de la corriente, i , en función de menos la raíz cuadrada del tiempo, $t^{-1/2}$, para el transitorio obtenido a un potencial de 820mV, en donde se tiene la corriente límite del sistema y el sistema está controlado únicamente por el transporte de masa.

La gráfica muestra que i y $t^{-1/2}$ son directamente proporcionales, la expresión matemática que describe este comportamiento es la siguiente:

$$i_{pa}(\mu A) = (5.237 \pm 0.003) \left(\mu A s^{\frac{1}{2}} \right) t^{\frac{1}{2}} + (0.468 \pm 0.002)(A\mu) \quad (6.6)$$

donde R^2 de 0.999. A partir de la pendiente $5.237 \pm 0.003 \mu A s^{1/2}$ de la gráfica i vs. $t^{-1/2}$ (Inserto de la Figura 6.12) y de la ecuación de Cottrell (6.7) se obtiene un valor de $(4.6452 \pm 0.2135) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para D , el cual es estadísticamente igual al calculado mediante la técnica de VC en condiciones estáticas.

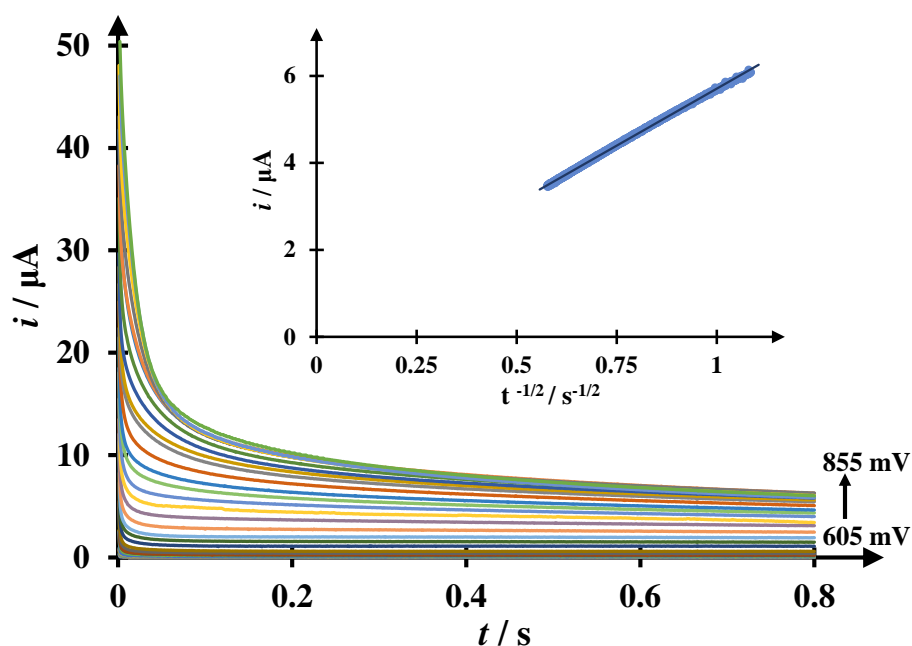


Figura 6.12. Familia de transitorios para el sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a potenciales aplicados (605 a 855 mV). El inserto muestra la tendencia de la i en función de $t^{-1/2}$, para el transitorio obtenido a 820 mV.

6.2.4 Cálculo del número de electrones

6.2.4.1 Voltamperometría de corriente muestreada

El número de electrones, se puede calcular construyendo graficas de la i en función del potencial, E ; para lo cual se toma la i a diferentes tiempos de muestreo, τ , de la familia de cronoamperograma de la Figura 6.12. Una vez obtenidos los voltamperogramas de i muestreada, se pueden obtener a su vez gráficas del E en función del $\log(i_l - i/i)$ a distintos τ , para las cuales es válida la ecuación de Nernst para sistemas controlados por la transferencia de masa:

$$E = E_{1/2} + 2.203 \frac{RT}{nF} \log \left(\frac{i_l - i}{i} \right) \quad (6.8)$$

donde E es el potencial del electrodo, $E_{1/2}$ es el potencial de onda media, i es la corriente, i_l es la corriente límite, n es el número de electrones, T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases [10].

En la Figura 6.13, pueden observarse las curvas de i vs. E , las cuales tienen forma parecida a los voltamperogramas cíclicos (Figura 6.10) obtenidos sin agitación; en donde al incrementa el E la corriente aumenta hasta alcanzar una i_l en 820 mV, lo que indica que el proceso de oxidación está controlado únicamente por el transporte de masa. También puede observarse, que la corriente de los VC aumenta con el tiempo.

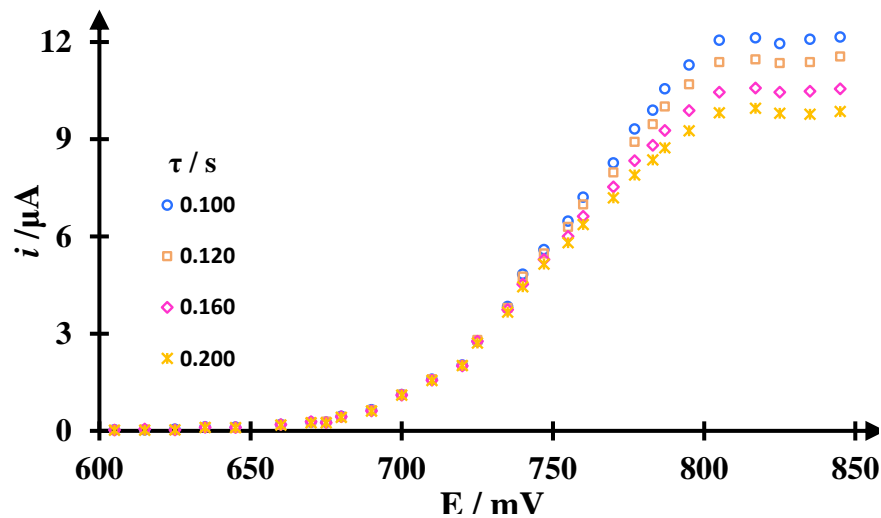


Figura 6.13. Variación de la i en función del E para diferentes tiempos de muestreo τ , obtenida a partir de los transitorios de la Figura 6.12.

Empleando la ecuación (6.8) y los voltamperogramas de i muestreada de la Figura 6.13, se obtuvo la gráfica E vs. $\log [(i_l - i)/i]$ para un τ de 0.160 s, en donde se observa una relación lineal cuya ecuación es la siguiente:

$$E(mV) = (-51.431 \pm 0.488)(mV) \log \left(\frac{i_l - i}{i} \right) + (754.948 \pm 0.352)(mV) \quad (6.9)$$

con un R^2 de 0.999. A partir de la pendiente -51.431 mV de las ecuaciones (6.9) y de la pendiente $2.203 RT/nF$ de la ecuación Nernst (6.8) es posible obtener un valor de $n = 1.167 \pm 0.007$ y de $E_{1/2} = 0.7454 \pm 0.0004$ para $\tau = 0.160$ s.

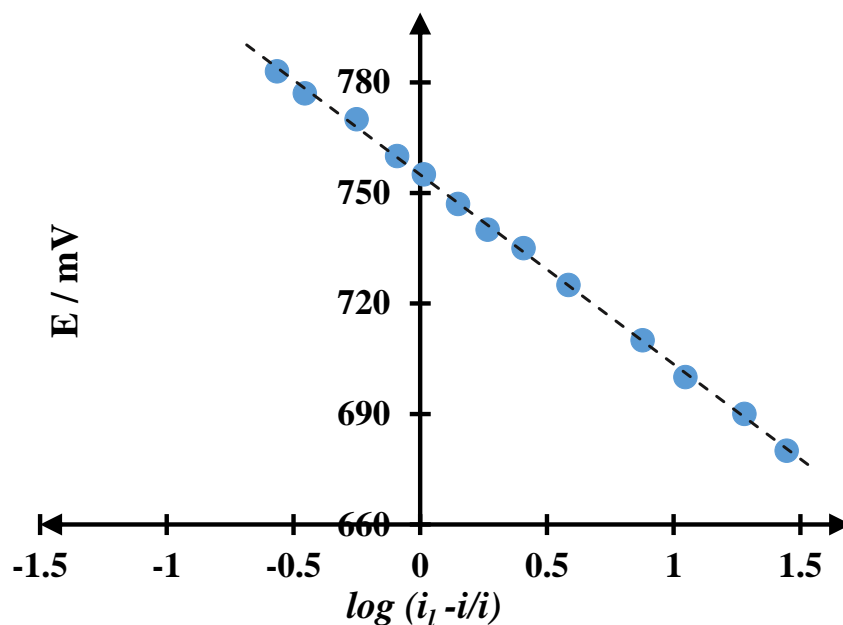


Figura 6.14. Gráfica del E en función de $\log(i_l - i/i)$ para un τ de 160 ms.

De la misma forma, se construyeron las gráficas E vs. $\log [(i_l - i)/i]$ y se obtuvieron los valores de $E_{1/2}$ y de n para distintos τ de 0.040 a 0.280 s. En la Tabla 6.1, se presentan los valores de las pendientes, $E_{1/2}$ y n a los diferentes τ . El número de electrones estimado coincide con lo propuesto en los trabajos de Radi *et al.* [1] y Levent *et al.* [3] para el proceso de oxidación I de la MT.

Tabla 6.1. Pendientes, $E_{1/2}$ y n obtenidos de las curvas E vs. $\log(i_l - i/i)$, a diferentes τ de muestreo.

τ / s	Pendiente / V	$E_{1/2}$ / V	n
0.040	-0.0529 ± 0.0004	0.7588 ± 0.0003	1.0690 ± 0.0098
0.060	-0.0514 ± 0.0004	0.7549 ± 0.0003	1.1005 ± 0.0104
0.080	-0.0504 ± 0.0005	0.7524 ± 0.0003	1.1229 ± 0.0116
0.100	-0.0499 ± 0.0005	0.7508 ± 0.0003	1.1321 ± 0.0118
0.120	-0.0497 ± 0.0005	0.7494 ± 0.0003	1.1393 ± 0.0125
0.160	-0.0496 ± 0.0005	0.7475 ± 0.0003	1.1409 ± 0.0123
0.200	-0.0494 ± 0.0005	0.7461 ± 0.0003	1.1450 ± 0.0135
0.240	-0.0492 ± 0.0006	0.7448 ± 0.0004	1.1488 ± 0.0160
0.280	-0.0493 ± 0.0006	0.7439 ± 0.0004	1.1462 ± 0.0144

6.2.4.2 Voltamperometría diferencial de pulso

Con el fin de corroborar el valor de n , se utiliza la técnica de voltamperometría diferencial de pulso en estado estacionario, ya que de acuerdo con de acuerdo con Parry y Osteryoung [11] y Brett y Brett [12] es posible estimar el n cuando la amplitud de pulso, ΔE , se aproxima a cero a 25 °C, al medir la amplitud del pico a la altura media de éste, $W_{1/2}$, de los voltamperogramas diferenciales de pulso, donde $W_{1/2}$ está dado por la ecuación (6.10):

$$W_{1/2} = \frac{3.52RT}{nF} \quad (6.10)$$

donde R es la constante universal de los gases, n es el número de electrones, T la temperatura y F es la constante de Faraday.

En la Figura 6.15, se muestran los voltamperogramas diferenciales de pulso del sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) obtenidos a diferentes ΔE , en un intervalo de 5 a 50 mV, renovando la superficie antes de cada medición. Durante los experimentos se

mantuvo una temperatura constante de 25°C y una atmósfera inerte. Los voltamperogramas obtenidos a ΔE menores, presentan un pico de oxidación con una corriente máxima en 730 mV, correspondiente a la oxidación de la MT. Conforme se aumentan la ΔE , el pico se desplaza ligeramente hacia potenciales más positivos de 750 mV, y su intensidad de corriente aumenta.

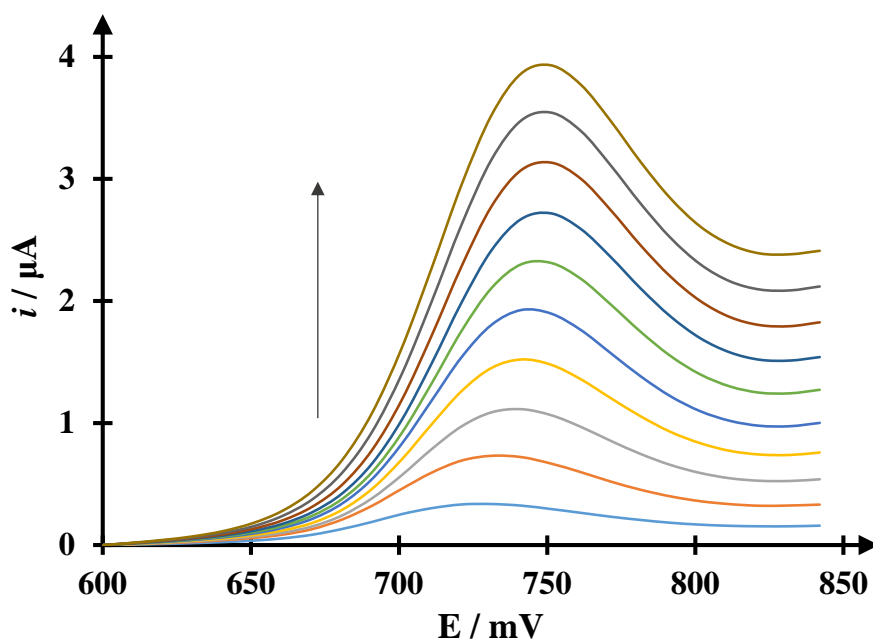


Figura 6.15. Voltamperogramas diferenciales de pulso para el sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001M de HClO₄ (pH 3) a diferentes amplitudes de pulso (5 a 50 mV).

Midiendo la $W_{1/2}$ de los voltamperogramas de la Figura 6.15 y usando la ecuación (6.10) es posible calcular el n a las diferentes ΔE aplicadas. En la Tabla 6.2, se presentan los valores estimados de $W_{1/2}$ y n para las distintas amplitudes de pulso. Como se puede observar en la Tabla 6.2, el número de electrones transferidos se aproxima a $n = 1$ cuando ΔE tiende a cero; lo que concuerda con el n estimado a partir de las curvas E vs. $\log[(i_l - i)/i]$ obtenidas a diferentes τ del estudio cronoamperométrico.

Tabla 6.2. Amplitud de onda media, $W_{1/2}$, y número de electrones, n , obtenidos a diferentes ΔE a partir de los VDP de la Figura 6.15 y la ecuación (6.10).

$\Delta E / \text{mV}$	$W_{1/2} / \text{V}$	n
50	0.0753 ± 0.0015	1.1942 ± 0.0240
45	0.0742 ± 0.0014	1.2119 ± 0.0243
40	0.0732 ± 0.0014	1.2285 ± 0.0247
35	0.0733 ± 0.0014	1.2268 ± 0.0246
30	0.0736 ± 0.0014	1.2218 ± 0.0245
25	0.0740 ± 0.0014	1.2152 ± 0.0244
20	0.0737 ± 0.0014	1.2201 ± 0.0245
15	0.0760 ± 0.0015	1.1832 ± 0.0237
10	0.0781 ± 0.0015	1.1514 ± 0.0231
5	0.0817 ± 0.0016	1.1007 ± 0.0221

6.2.5 Cálculo del coeficiente de difusión en condiciones de convección forzada

6.2.5.1 Voltamperometría lineal de disco rotatorio

A partir de un estudio de voltamperometría lineal de disco rotatorio, bajo condiciones de convección forzada es posible estimar el valor del D . En la Figura 6.16, se muestran los voltamperogramas lineales del sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001M de HClO_4 (pH 3) aplicando una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} y variando la velocidad de rotación, ω , de 50 a 300 rpm; antes de cada medición se renovó la superficie del EPC. Los experimentos se llevan a cabo a una temperatura constante de 25°C y manteniendo una atmósfera de N_2 . En los voltamperogramas, se observa un aumento de la i hasta alcanzar la i_l en 820 mV a medida que se incrementa el E . También se aprecia, el aumento de la i_l de los voltamperogramas al incrementar la velocidad de rotación.

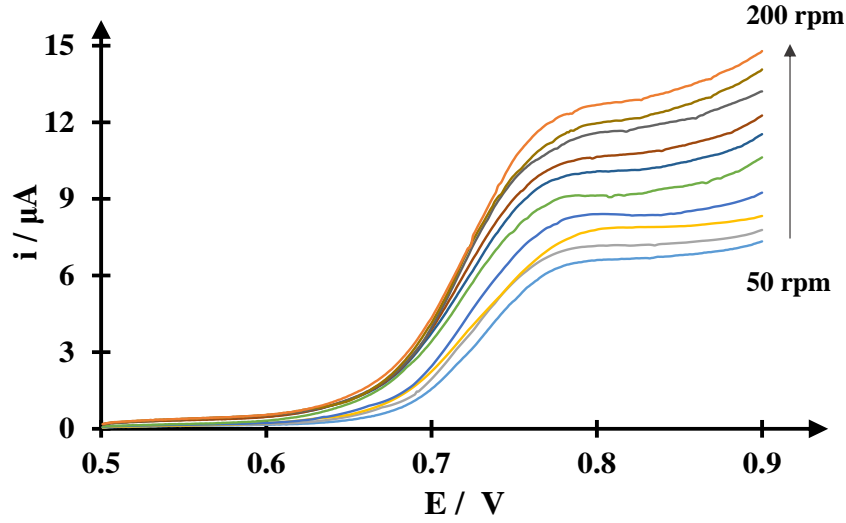


Figura 6.16. Voltamperogramas lineales de disco rotatorio para el sistema EPC/ 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a un velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹, variando la velocidad de rotación de 50 a 200 rpm.

La Figura 6.17, presenta la gráfica de la i_l en función de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación, $\omega^{1/2}$, obtenida a partir de la Figura 6.16. En la gráfica se observa que la i_l varia proporcionalmente con $\omega^{1/2}$, la ecuación que se obtuvo del ajuste lineal es la siguiente:

$$i_{pa}(\mu A) = (0.1571 \pm 0.002) \left(\mu A s^{\frac{1}{2}} \right) \omega^{\frac{1}{2}} + (0.368 \pm 0.028)(A\mu) \quad (6.11)$$

donde R^2 de 0.998. Este comportamiento se describe mediante la ecuación de Levich (6.12), en donde i_l es directamente proporcional a $\omega^{1/2}$ para proceso totalmente controlado por la difusión:

$$i_{l,a} = 0.2nFAD^{2/3}C\nu_c^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (6.12)$$

donde ν_c es la viscosidad cinemática, ω es la velocidad de rotación, F es la constante de Faraday, i_l es la corriente límite, n el número de electrones, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión y C la concentración del analito [10]. A partir de la pendiente $0.1571 \pm 0.002 \mu A s^{1/2}$ de la ecuación (6.11) correspondiente a la gráfica i_l vs. $\omega^{1/2}$ y la ecuación de Levich (6.12), se calcula un valor de $(5.4193 \pm 0.2634) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el D de la MT en el proceso de oxidación I.

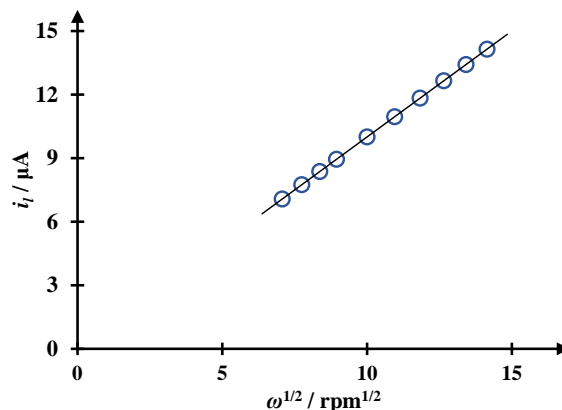


Figura 6.17. Gráfica de la corriente límite de MT obtenida a partir de los VC de la Figura 6.16 en función de $\omega^{1/2}$, evaluada a $E_{\text{imp}}=820$ mV.

En la Tabla 6.3, se comparan los valores del coeficiente de difusión obtenidos por las diferentes técnicas en condiciones estáticas y de convección forzada, así como el valor reportado en la literatura por Gómez *et al.* [6]. Como puede observarse en la Tabla, los valores obtenidos en este trabajo por VC y CA en estado estacionario dan valores estadísticamente iguales, mientras que el valor obtenido por VL-DR en convección forzada da un valor cercano a éstos del mismo orden. También se observa, que el valor reportado por Gomez *et al.* [6] es del mismo orden a pesar de diferir con los valores calculados en este trabajo, lo cual probablemente se debe a que se consideraron 2 electrones para el cálculo de éste. Finalmente, es importante mencionar, que mediante VL-DR en convección forzada, es posible obtener una buena estimación del valor de D , ya que esta técnica permite mantener al sistema controlado por el transporte de masa, además el método toma en cuenta diversos parámetros que pueden intervenir en la difusión de la MT hacia la superficie del electrodo para su oxidación.

Tabla 6.3. Valor del coeficiente de difusión obtenido por diferentes técnicas electroquímicas, considerando un valor de $n = 1$.

Técnica	Condiciones hidrodinámicas	$10^5 D_R / \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	Referencia
VC	Estacionario	7.50	[6]
VC	Estacionario	4.5437 ± 0.2159	Este trabajo
CA	Estacionario	4.6452 ± 0.2135	Este trabajo
VL-DR	Convección forzada	5.4193 ± 0.2634	Este trabajo

6.3 Conclusiones

De estos resultados se concluye que el mecanismo redox de la MT es EQE, tal como se ha propuesto en la literatura. Además, los resultados indican que el proceso de oxidación de la MT no se ve afectada por la formación de la quinonaimina que se forma mediante la reacción química acoplada al proceso. Dentro de los parámetros electroquímicos de la MT, se encontró que el proceso de oxidación I está controlado por la difusión, lo que permitió el cálculo del número de electrones involucrados en el proceso usando las técnicas voltamperométricas de corriente muestreada y diferencial de pulso en estado estacionario, obteniendo $n = 1$ por ambas técnicas, lo que comprueba su fiabilidad. También, fue posible calcular el coeficiente de difusión por medio de las técnicas de voltamperometría cíclica y cronoamperometría en estado estacionario, así como con la técnica de voltamperometría lineal de disco rotatorio en condiciones de convección forzada, obteniendo valores muy cercanos entre ellos, lo que demuestra la fiabilidad del resultado.

6.4 Referencias

- [1] A. Radi, G.. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.
- [2] W. Qu, F. Wang, S. Hu, D. Cui, Electrocatalytic properties and voltammetric determination of melatonin at a nanostructured film electrode, *Microchim. Acta.* 150 (2005) 109–114.
- [3] A. Levent, Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 21 (2012) 114–119.
- [4] H. Bagheri, A. Afkhami, P. Hashemi, M. Ghanei, Simultaneous and sensitive determination of melatonin and dopamine with Fe₃O₄ nanoparticle-decorated reduced graphene oxide modified electrode, *RSC Adv.* 5 (2015) 21659–21669.
- [5] A. Babaei, A.R. Taheri, I. Khani Farahani, Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 183 (2013) 265–272.
- [6] F.J.V. Gomez, A. Martín, M.F. Silva, A. Escarpa, Screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes or graphene for simultaneous determination of melatonin and serotonin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1925–1931.

- [7] J. Smajdor, R. Piech, M. Pięk, B. Paczosa-Bator, Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 278–284.
- [8] H. Zeinali, H. Bagheri, Z. Monsef-Khoshhesab, H. Khoshsafar, A. Hajian, Nanomolar simultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO₂-Co₃O₄@rGO nanocomposite, *Mater. Sci. Eng. C*. 71 (2017) 386–394.
- [9] I.M. Apetrei, C. Apetrei, Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products, *Int. J. Nanomedicine*. 11 (2016) 1859–1866.
- [10] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, 2da. edici, JOHN WILEY & SONS, IN, United States of America, 2001.
- [11] E.P. Parry, R.A. Osteryoung, Evaluation of Analytical Pulse Polarography, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1634–1637.
- [12] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, 1st ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1993.
- [13] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edit, John Wiley & Sons, 2006.
- [14] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response, *Electroanalysis*. 10 (1998) 336–342.
- [15] J.L. Corujo-Antuña, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 421–9.

Capítulo 7. Comportamiento Electroquímico de la Melatonina usando EPC modificados

A partir de un estudio de voltamperometría cíclica, es posible conocer el comportamiento redox de las distintas especies electroactivas. Generalmente, este comportamiento cambia dependiendo del material del electrodo, así como de los materiales nanoestructurados que se usan para la modificación de su superficie.

Por otro lado, variar la velocidad de barrido de potencial permite conocer cómo está limitado el transporte de masa en un sistema electroquímico, el cual puede darse por un proceso difusivo o adsortivo. Dentro de la literatura, algunos trabajos reportan el estudio del primer proceso de oxidación de la MT sobre electrodos de distintos materiales como: pasta de carbono sin modificar [1,2] y modificada con nanopartículas de Fe_3O_4 [3], carbón vítreo sin modificar [1] y modificado con nanopulvos de negro de carbono [4], pasta de carbono con líquido iónico sin modificar [5] y modificada con óxido de grafeno decorado con nanopartículas de $\text{SnO}_2\text{-Co}_3\text{O}_4$ [6]. En estos trabajos, se encontrando que el transporte de carga está limitado por el transporte de masa. Sin embargo, al usar un electrodo pasta de carbono modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple Qu *et al.* [7], encontraron que el proceso es adsortivo, años más tarde Levent *et al.* [8], obtuvo el mismo resultado al usar un electrodo de diamante dopado con boro. A pesar de que ya se ha investigado el comportamiento redox de la MT sobre un EPC, aún no se ha estudiado utilizando un EPC modificado con NPsAu o βCD o NPsAu• βCD . Es por ello, que este Capítulo se enfoca en estudiar el comportamiento electroquímico de la MT sobre los EPC-NPsAu, EPC- βCD y EPC-NPsAu• βCD .

Para estudiar el comportamiento electroquímico de la MT sobre los distintos EPC modificados, se hacen estudios de voltamperometría cíclica donde se varía la velocidad de barrido de potencial. Los estudios se hacen en una ventana de potencial, que permite apreciar el primer proceso de oxidación de la MT. Para fines prácticos, los picos se renombran de la siguiente manera: el pico anódico correspondiente a la oxidación de la MT es I, el pico catódico correspondiente a la reducción del radical catión formado mediante la oxidación es

II y el pico anódico correspondiente a la oxidación del derivado indólico 4,5-dihidróxido que se forma a partir de la reacción química acoplada es el pico III.

7.1 Metodología

7.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se prepararan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con los siguientes reactivos: β CD (Fluka 97 %), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70 %), HAuCl_4 (Sigma-Aldrich $\geq 99.9\%$), $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ (Sigma-Aldrich 103.2%), NaOH (Sigma-Aldrich 98.4%), grafito en polvo (AlfaAesar 99.9995%), aceite mineral (Fluka), nafion a base de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (solución de resina perfluorada, Sigma-Aldrich), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Sigma-Aldrich 96%) y carbón vulcan XC-72R (negro de carbono de alta conductividad en polvo con un diámetro promedio de 50nm, Cabot).

7.1.2 Instrumentación

Los estudios de voltamperometría cíclica, se llevaron a cabo en un potencióstato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100, utilizando una celda típica de tres electrodos, como contraelectrodo un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo un EPC modificado con NPsAu o β CD o $\text{NPsAu}\cdot\beta$ CD. Los EPC, se preparan siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al* [9] y su modificación con β CD o $\text{NPsAu}\cdot\beta$ CD se hace tal como lo describe Roa *et al.* [10], descrito a detalle en el Capítulo 4.

7.2 Resultados

7.2.1 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC-NPsAu

Con el propósito de observar el comportamiento electroquímico de la MT al usar un EPC modificado con NPsAu, se hizo un estudio voltamperométrico variando la velocidad de barrido. En la Figura 7.1, se muestran los voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC-NPsAu / 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3), a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 20 a 200 mVs⁻¹. El primer voltamperograma cíclico obtenido a una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹, presenta un pico de oxidación I en 561 mV y uno de reducción II en 254 mV. El segundo voltamperograma obtenido consecutivamente al aplicar una velocidad de barrido de 30 mVs⁻¹, además de los picos I y II muestra el pico de oxidación III correspondiente a la oxidación del subproducto en 392 mV. Al incrementar la velocidad de barrido, los picos I y III se desplazan hacia potenciales mayores 908 y 748 mV, respectivamente; mientras que el pico II se mueve hacia potenciales menores 473 mV. Con el aumento de la velocidad de barrido, la corriente de los picos se incrementa y los picos de oxidación se traslapan impidiendo cada vez más una apreciación correcta de la corriente del pico I.

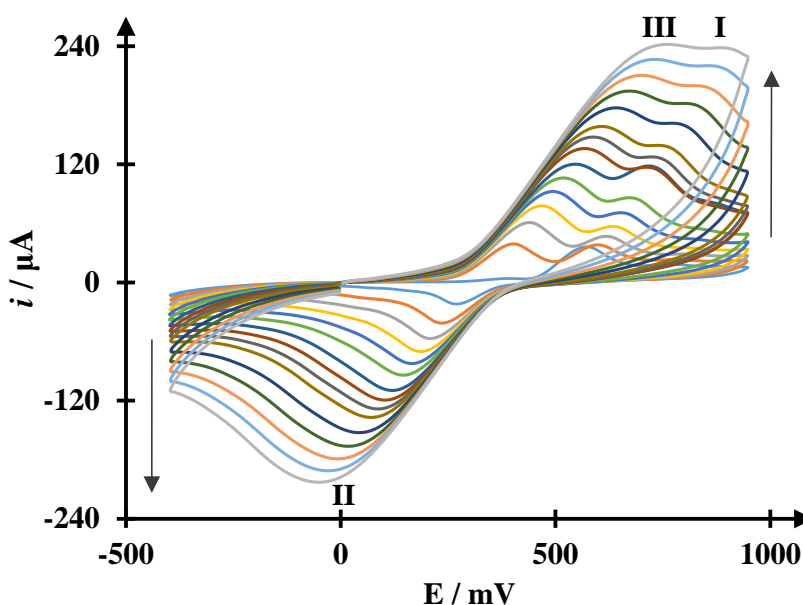


Figura 7.1. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC-NPsAu/ 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a diferentes velocidades de barrido (20-200 mVs⁻¹).

Al comprar los voltamperogramas de la Figura 7.1, con los obtenidos sobre un EPC sin modificar (Figura 6.7, Capítulo 6), se observa una respuesta 7 veces mayor en la corriente cuando se emplea un EPC-NPsAu, lo que es más notorio para el pico de reducción. Además, se aprecia el desplazamiento de los picos de oxidación hacia potenciales menores, así como su traslape a medida que aumenta la velocidad de barrido. Esto puede apreciarse claramente en la Figura 7.2, la cual muestra la comparación de los voltamperogramas obtenidos a 100 mVs^{-1} , al usar un EPC sin modificar y modificado con NPsAu.

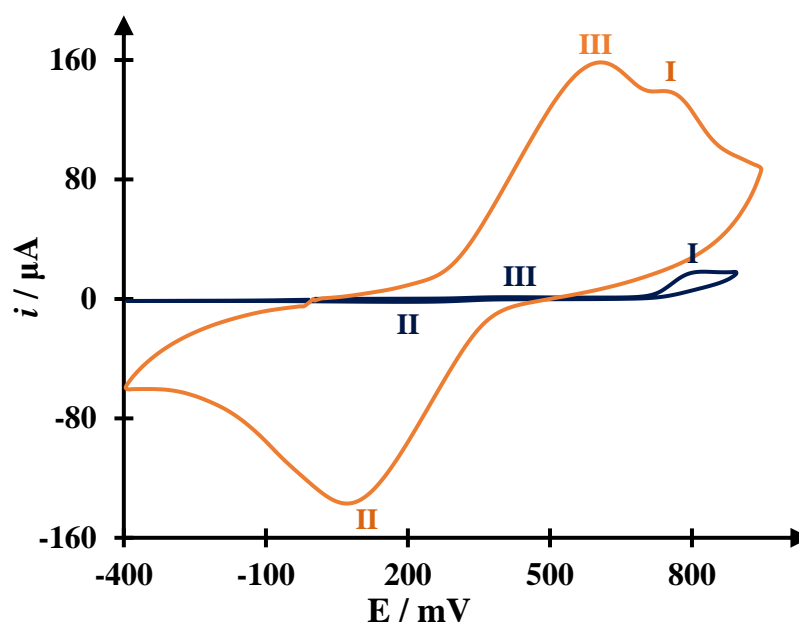


Figura 7.2. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} utilizado un EPC (—) y un EPC-NPsAu (—).

Estos resultados indican, que las NPsAu mejoran la sensibilidad del EPC hacia la MT y favorecen su reacción oxidación. Sin embargo, debido al traslape de los picos de oxidación I y III, no es posible analizar el pico correspondiente a la oxidación de la MT y realizar estudios posteriores, que nos permitan determinar cómo está controlado el proceso electroquímico. La elaborada preparación de las NPsAu, así como el traslape de los picos, hacen poco conveniente la cuantificación de la MT utilizando un EPC con esta modificación.

7.2.2 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC- β CD

Para poder estudiar la influencia de la β CD sobre el comportamiento electroquímico de la MT, se modifica la superficie de los EPC mediante polimerización aplicando 5, 15 y 25 ciclos, tal como se describe en el Capítulo 4. Obtenidos los EPC- β CD, se realizan estudios voltamperométricos variando la velocidad de barrido en presencia de MT. La Figura 7.3 muestra los voltamperogramas cíclicos del sistema 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a diferentes velocidad de barrido (20-200 mVs^{-1}), usando un EPC- β CD modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. En los VC se observan los picos de oxidación I y III, así como el pico de reducción II, para los tres sistemas. El pico I, a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} aparece en 725 mV y al aumentar la velocidad de barrido se mueve ligeramente hacia un potencial más positivo de 785 mV, aproximadamente. El pico III, a una velocidades de barrido de 30 mVs^{-1} se encuentra en 345 mV aproximadamente, mientras que al aumentar la velocidad de barrido se mueve hacia potenciales más positivos y su desplazamiento es mayor al aumentar el número de ciclos aplicados de β CD; 369, 379 y 399 mV, para 5, 15 y 25 ciclos, respectivamente. El pico II, a velocidades de barrido bajas se presenta en 301 mV y al aumentar la velocidad de barrido se desplaza a un potencial menor de 255mV, aproximadamente. En los tres sistemas, la corriente de los picos se incrementa conforme aumenta la velocidad de barrido.

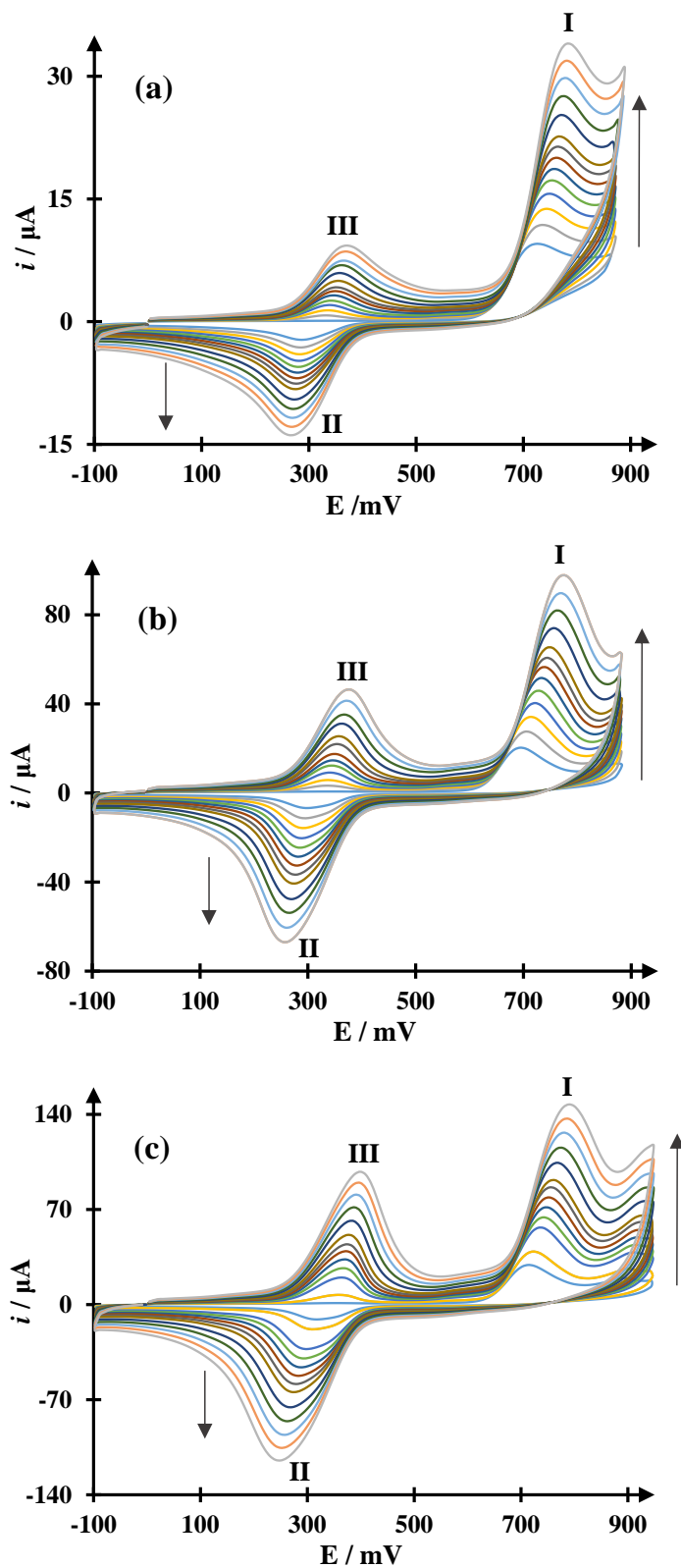


Figura 7.3. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a diferentes velocidades de barrido, usando un EPC- β CD modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos.

En los VC de la Figura 7.3 también se observa, que al aumentan el número de ciclos aplicados de β CD, hay una mayor definición de los picos, así como un incremento en la intensidad de corriente hasta 4 veces mayor al aplicar 25 ciclos. Lo cual puede observarse más claramente en la Figura 7.4, donde se comparan los VC obtenidos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} .

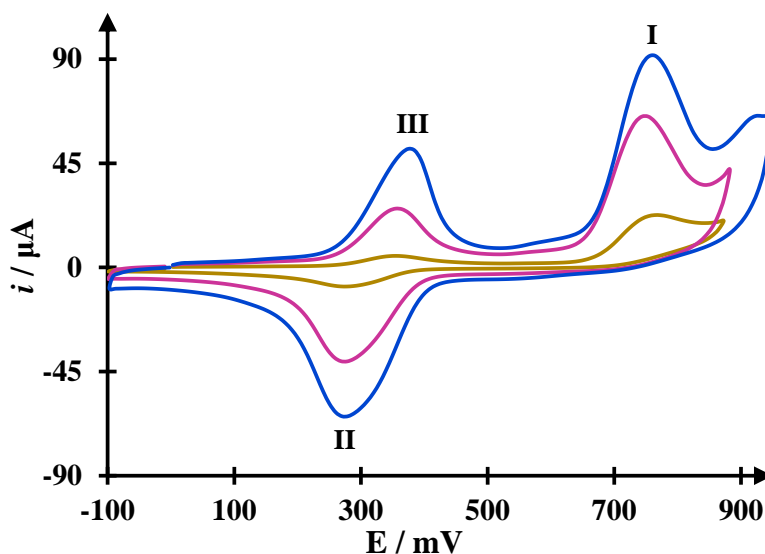


Figura 7.4. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} utilizando un EPC- β CD modificado con 5 (—), 15 (—) y 25 (—) ciclos.

Los VC obtenidos al emplear los EPC- β CD (Figura 7.4), muestran picos separados y definidos con una mayor intensidad de corriente en comparación con los VC obtenidos con el EPC sin modificar (Figura 6.7, Capítulo 6). Además, se observa un desplazamiento de los picos de oxidación hacia potenciales menores y del pico de reducción hacia potenciales más positivos. Esto puede apreciarse en la Figura 7.5, la cual muestra la comparación de los voltamperogramas obtenidos a 100 mVs^{-1} al usar un EPC y EPC- β CD_(15 ciclos), en donde se tiene un aumento de la corriente 3 veces mayor al usar un EPC- β CD_(15 ciclos) en el pico de oxidación I.

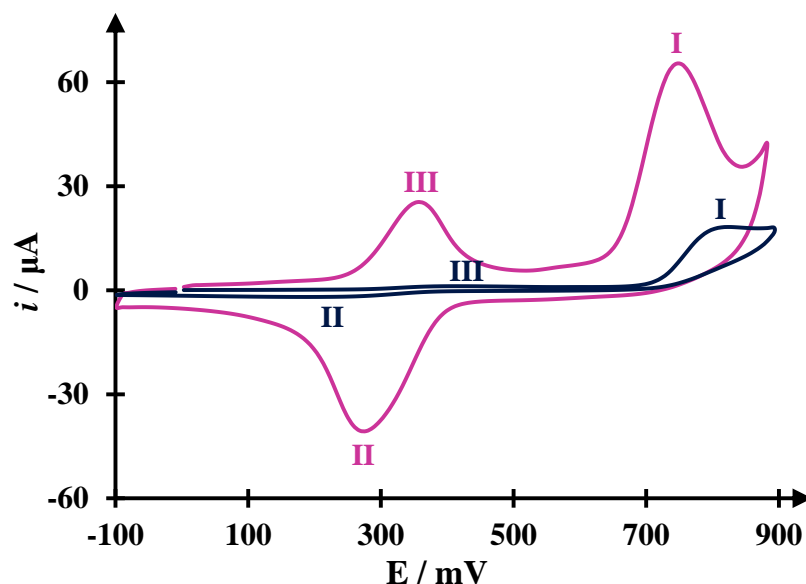


Figura 7.5. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} utilizado un EPC (—) y un EPC- $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—).

A partir de los resultados, puede presumirse que el aumento en la intensidad de la corriente a medida que se incrementa el número de ciclos aplicados, se debe al crecimiento del área electroactiva. La definición y separación de los picos se debe a la formación de los complejos de inclusión de la βCD con la MT y con el 4,5 dihidróxido generado mediante la reacción química acoplada.

Debido a que los picos de los VC de la Figura 7.3 tienen una forma tipo gaussiana o simétrica, se analiza el comportamiento entre la corriente del pico y la velocidad de barrido, a través de una gráfica de $\log(i_p)$ en función de $\log(v)$, con el objeto de saber si el proceso de oxidación de la MT está controlado únicamente por difusión o existe un proceso de adsorción presente. De esta forma, si el comportamiento del proceso es de tipo difusivo la pendiente de la gráfica $\log(i_p)$ vs. $\log(v)$ tendrá un valor cercano a 0.5; si existe un proceso de adsorción en la superficie del electrodo la pendiente tiene un valor de 1.0 y si el proceso es mixto, es decir difusivo y adsorptivo al mismo tiempo la pendiente tendrá un valor de 0.6 a 0.9. La Figura 7.6, muestra la gráfica de la tendencia $\log(i_{pa})$ vs. $\log(v)$, cuando se emplea un EPC- βCD modificado con (a)5, (b)15 y (c)25 ciclos obtenida a partir de los datos de la Figura 7.2. En los tres sistemas, las curvas presentan una relación lineal del $\log(i_{pa})$ con respecto del $\log(v)$.

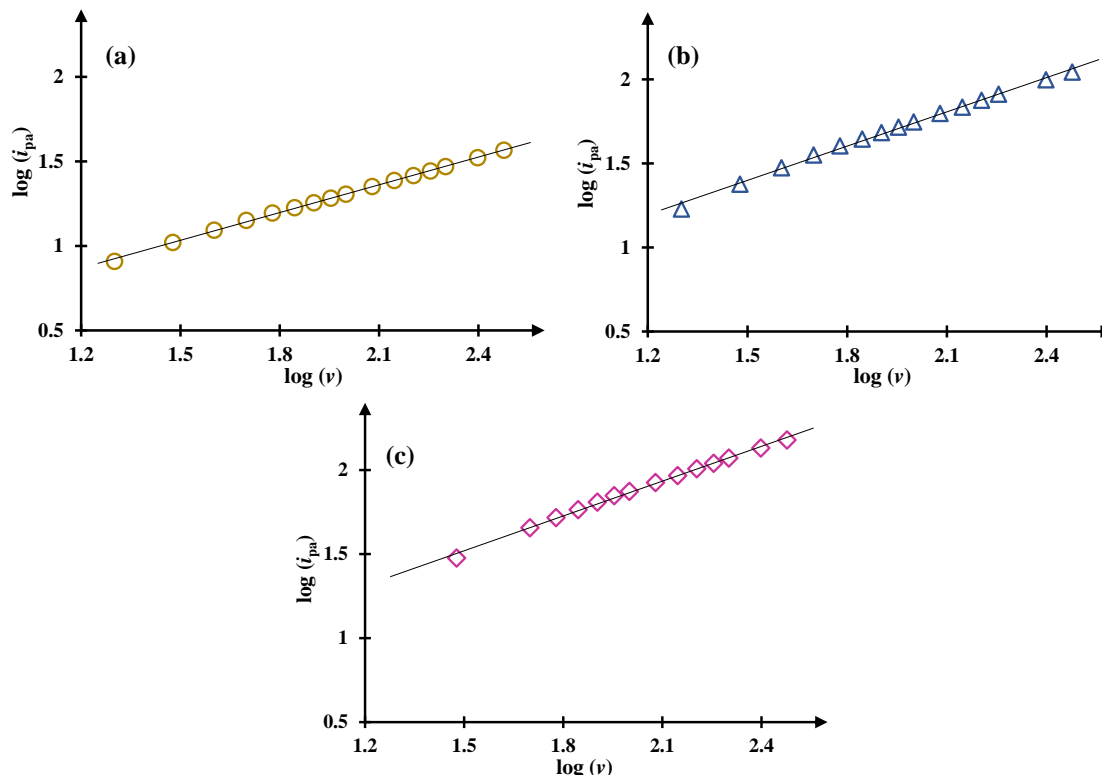


Figura 7.6. Gráfica del $\log(i_{pa})$ en función del $\log(v)$, correspondiente al proceso de oxidación de la MT, usando un EPC- β CD modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 7.2.

La expresión matemática que representan a cada recta de la Figura 7.4, se muestra en la Tabla 7.1, junto con el coeficiente de correlación, R^2 . Al observar las pendientes de las ecuaciones se deduce que la oxidación de la MT es un proceso controlado por la difusión que pasa a ser un proceso mixto al aplicar 15 y 25 ciclos de β CD, es decir un proceso controlado por la difusión y adsorción. El cambio de un proceso controlado por la difusión a uno mixto, confirma la formación del complejo de inclusión de la β CD y la MT.

Tabla 7.1. Ecuaciones de las curvas $\log(i_{pa})$ vs. $\log(v)$, correspondientes al proceso de oxidación de la MT usando un EPC- β CD, aplicando diferentes número de ciclos.

1	Ecuación	R^2
0	$\log i_{pa} = (0.462 \pm 0.011) \log v + (0.288 \pm 0.023)$	0.991
5	$\log i_{pa} = (0.547 \pm 0.004) \log v + (0.212 \pm 0.008)$	0.999
15	$\log i_{pa} = (0.679 \pm 0.011) \log v + (0.380 \pm 0.022)$	0.996
25	$\log i_{pa} = (0.725 \pm 0.016) \log v + (0.410 \pm 0.032)$	0.991

7.2.3 Estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC-NPsAu• β CD

Una vez analizada la contribución de las NPsAu y de la β CD sobre el comportamiento electroquímico de la MT; se prosigue con el estudio de la influencia de las NPsAu sintetizadas con β CD al utilizarse en la modificación del EPC. Para ello, se estudia el efecto de la variación de la velocidad de barrido sobre MT mediante voltamperometría cíclica, al utilizar los EPC previamente modificados con NPsAu• β CD (procedimiento descrito en el Capítulo 4). En la Figura 7.7 se muestran los voltamperogramas cíclicos de la MT, obtenidos en una disolución 0.2 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3), a diferentes velocidad de barrido (20-200 mVs⁻¹). Como electrodo de trabajo se utiliza un EPC modificado mediante la polimerización de NPsAu• β CD aplicando con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. En los VC de los tres sistemas, se observan los picos de oxidación I y III, así como el pico de reducción II. El pico I, a 20 mVs⁻¹ se encuentra en 714 mV aproximadamente, al aumentar velocidad de barrido se desplaza hacia potenciales mayores: 790, 849 y 869 mV para 5, 15 y 25 ciclos, respectivamente. El pico III, a 30 mVs⁻¹ aparece en 352 mV aproximadamente, al incrementar la velocidad de barrido se mueve hacia potenciales más positivos: 399, 499 y 570 mV, para 5, 15 y 25 ciclos, respectivamente. El pico II, a velocidades bajas se observa en 290 mV aproximadamente, mientras que a velocidades altas se desplaza hacia potenciales menores: 248, 155, 80 mV, para 5, 15 y 25 ciclos, respectivamente. Los picos de oxidación I y II de los VC obtenidos con un EPC-NPsAu• β CD al aplicar 25 ciclos, se traslapan a altas velocidades de barrido, haciendo poco conveniente su uso para la determinación de la MT. Finalmente en todos los casos, la corriente de los picos se incrementa conforme la velocidad de barrido aumenta.

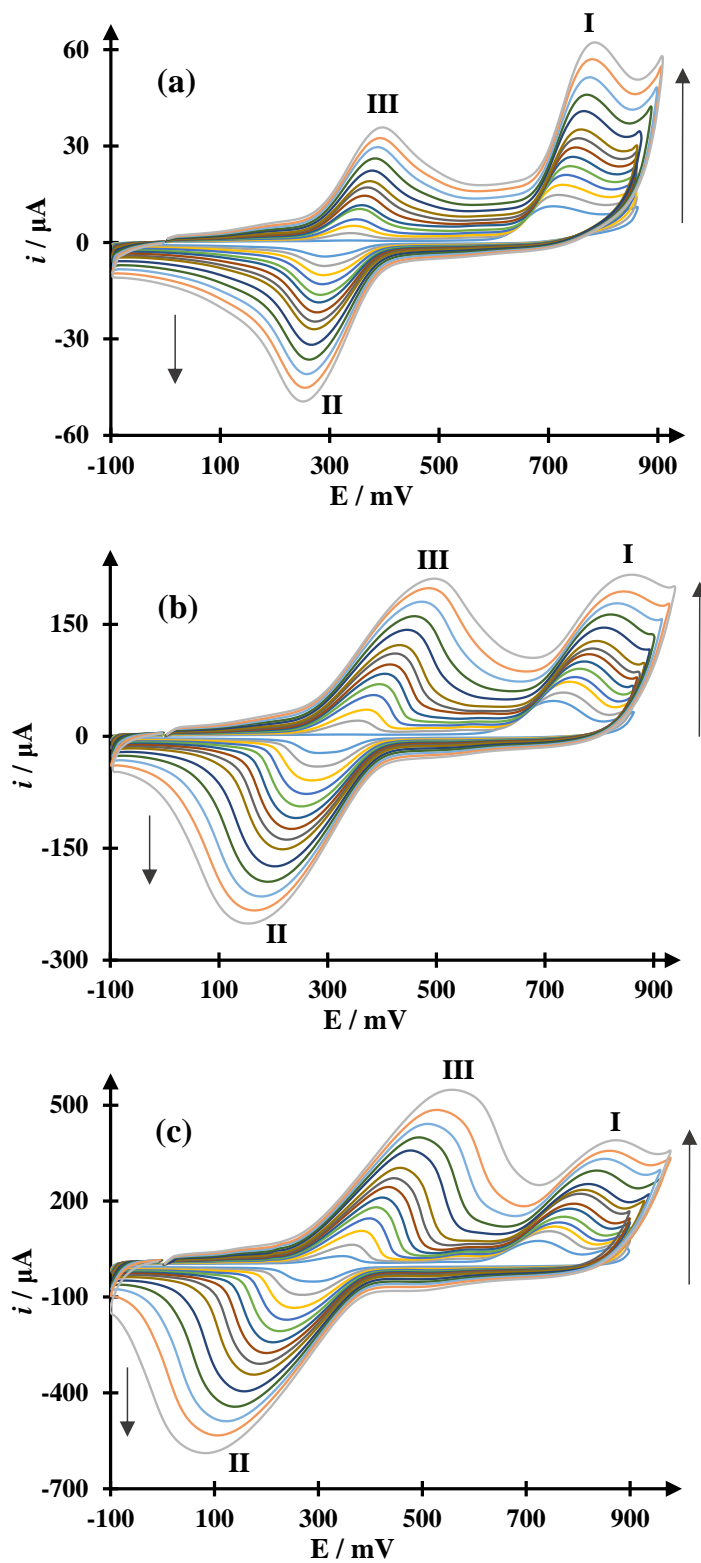


Figura 7.7. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a diferentes velocidades de barrido, usando un EPC-NPsAu- β CD modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos.

En los VC de la Figura 7.7, también se observa un incremento considerable en la intensidad de corriente a medida que aumentan los ciclos aplicados de NPsAu• β CD y una mayor definición de los picos, sobre todo en los picos III y II. Esto puede observarse en la Figura 7.8, donde se comparan los VC obtenidos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , al usar un EPC-NPsAu• β CD modificado con 5, 15 y 25 ciclos, en donde se tiene una corriente 6 veces mayor al aplicar 15.

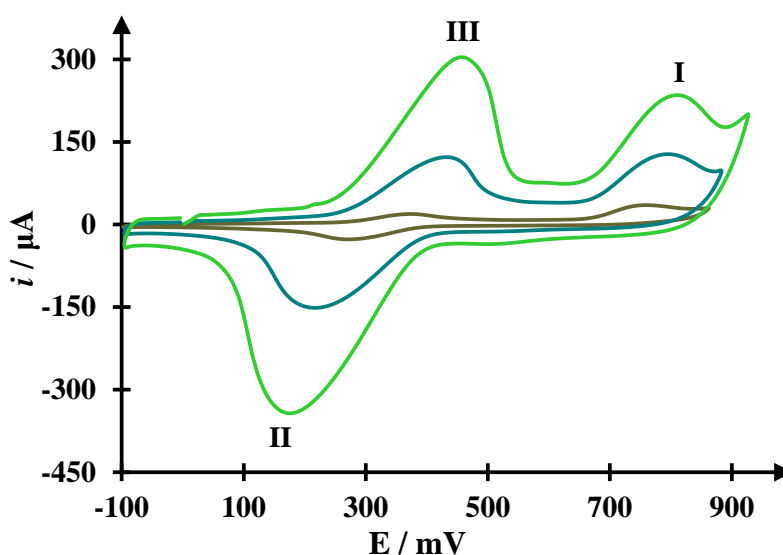


Figura 7.8. Voltamperogramas cíclicos para el sistema 0.2 mM MT en HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} , utilizado un EPC-NPsAu• β CD modificado con 5 (—), 15 (—) y 25 (—) ciclos.

Al contrastar los estudios de la MT variación de velocidad de barrido sobre un EPC (Figura 6.7, Capítulo 6), EPC- β CD (Figura 7.1) y EPC-NPsAu• β CD (Figura 7.7), los picos de los VC muestran una definición e intensidad de corriente con la siguiente tendencia de acuerdo al electrodo empleado: $\text{EPC} < \text{EPC-}\beta\text{CD} < \text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$. Además, cuando se utiliza un EPC modificado los picos se desplazan hacia potenciales menores, lo que indica que se requiere menor energía para oxidar la MT. Esto puede apreciarse claramente en la Figura 7.9, donde se presentan los VC obtenidos a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} usando un EPC, EPC- β CD_(15 ciclos) y EPC-NPsAu• β CD_(15 ciclos); en donde se aprecia una corriente aproximadamente 7 veces mayor al emplear un EPC-NPsAu• β CD_(15 ciclos) en el pico de oxidación I.

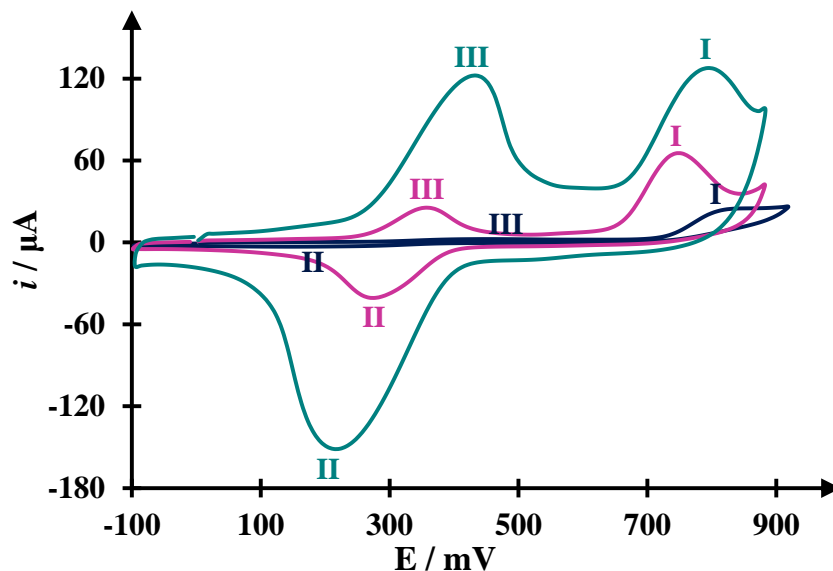


Figura 7.9. Comparación de VC para el sistema 0.2 mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 100 mVs^{-1} utilizado un EPC (—), EPC- $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—) y EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—).

De estos resultados se deduce, que el aumento de la corriente a medida que se incrementa el número de ciclos aplicados, se debe al crecimiento del área electroactiva. Así mismo, los EPC-NPsAu• βCD tienen un área electroactiva mayor a la de los EPC- βCD , ya que al usarse en el estudio de la MT, se obtiene una respuesta de la corriente mayor, esto concuerda con los resultados del cálculos del área electroactiva (Capítulo 5). De igual forma que cuando se usa un EPC- βCD , la definición y separación de los picos se debe a la formación de los complejos de inclusión de la βCD con la MT y con el 4,5 dihidróxido.

A partir de los VC obtenidos sobre EPC-NPsAu• βCD (Figura 7.7), se analiza la tendencia de la corriente del proceso de oxidación de la MT en función de la velocidad de barrido. Para ello, se construyen las gráficas de $\log(i_p)$ vs. $\log(v)$ del pico de oxidación I, las cuales se muestran en la Figura 7.10. Debido a que las gráficas muestran una relación lineal del $\log(i_{pa})$ con respecto del $\log(v)$, es posible conocer cómo está controlado el proceso de oxidación.

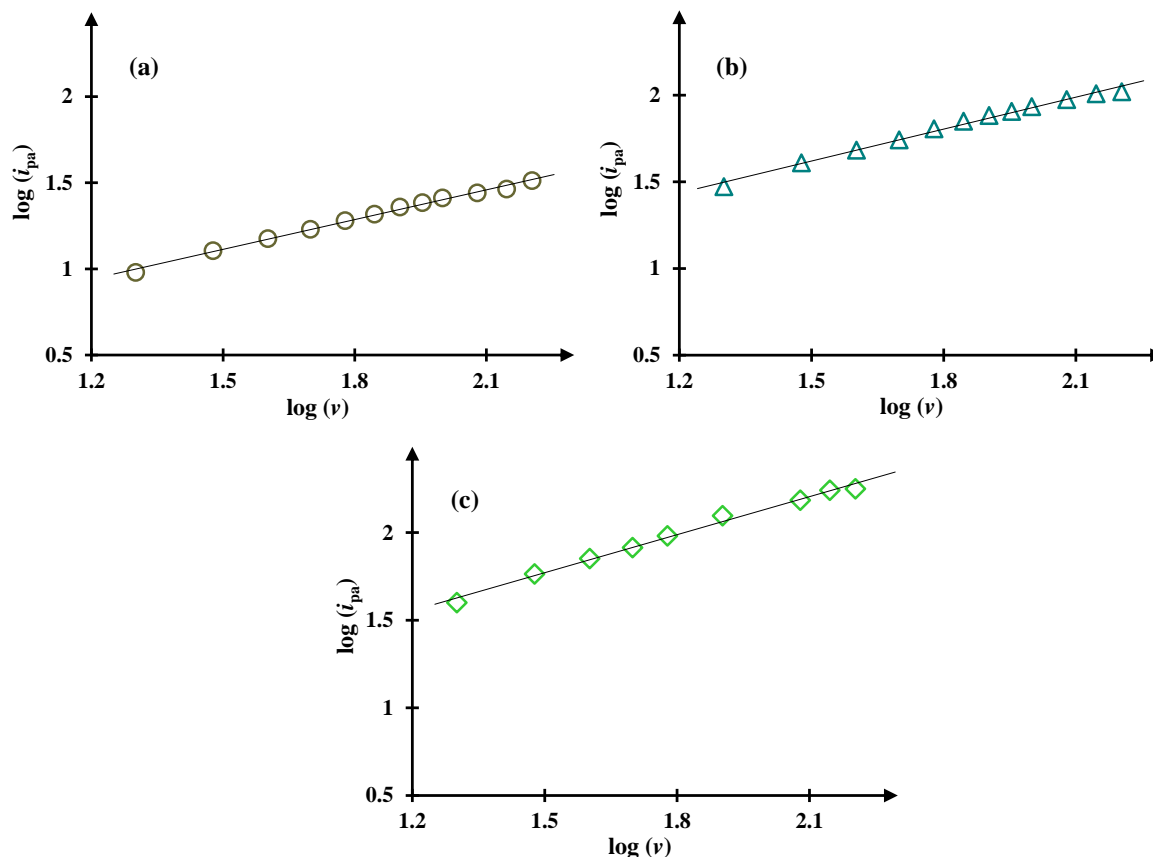


Figura 7.10. Gráfica del $\log(i_{pa})$ en función del $\log(v)$, correspondiente al proceso de oxidación de la MT, usando un EPC-NPs Au• β CD modificado con (a) 5, (b) 15 y (c) 25 ciclos. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 7.7.

En la Tabla 11, se presentan las ecuaciones matemáticas que representan a cada recta obtenidas hasta ahora. Las pendientes de las ecuaciones muestran, que el proceso de oxidación de la MT está controlado por la difusión. Sin embargo, al aplicar 15 ciclos de β CD o NPs Au• β CD el proceso muestra una contribución de adsorción y al aplicar 25 ciclos el proceso es más adsorptivo. El cambio de un proceso controlado por la difusión a uno mixto, se atribuye también a la formación del complejo de inclusión de la β CD y la MT.

Tabla 7.2. Ecuaciones de las curvas $\log(i_{pa})$ vs $\log(v)$ de la MT, usando los distintos electrodos.

Electrodo	No. de ciclos	Ecuación	R ²
EPC	0	$\log i_{pa} = (0.462 \pm 0.011) \log v + (0.288 \pm 0.023)$	0.991
	5	$\log i_{pa} = (0.547 \pm 0.004) \log v + (0.212 \pm 0.008)$	0.999
EPC-βCD	15	$\log i_{pa} = (0.679 \pm 0.011) \log v + (0.380 \pm 0.022)$	0.996
	25	$\log i_{pa} = (0.725 \pm 0.016) \log v + (0.410 \pm 0.032)$	0.991
EPC-NPsAu•βCD	5	$\log i_{pa} = (0.576 \pm 0.013) \log v + (0.249 \pm 0.024)$	0.994
	15	$\log i_{pa} = (0.613 \pm 0.017) \log v + (0.699 \pm 0.033)$	0.991
	25	$\log i_{pa} = (0.723 \pm 0.023) \log v + (0.686 \pm 0.043)$	0.992

7.3 Conclusiones

Al analizar el primer proceso de oxidación de la MT, se encontró que la modificación del EPC con NPsAu aumenta la respuesta de la corriente 7 veces, no obstante muestra un traslape de los picos de oxidación que impide su apreciación para su estudio. La modificación del EPC con βCD y NPsAu•βCD incrementa la corriente 3 y 7 veces al aplicar 15 ciclos, 5 y 13 veces al aplicar 25 ciclos, respectivamente; mejorando la respuesta de la señal del electrodo hacia la MT. Sin embargo, cuando se aplican 25 ciclos de NPsAu•βCD hay un traslape de los picos de oxidación, que también limita su apreciación para estudios posteriores. Los resultados también muestran, que al modificar el EPC con 15 y 25 ciclos de βCD o NPsAu•βCD, la oxidación de la MT cambia de un proceso controlado por la difusión a un proceso mixto; la contribución de la adsorción, el aumento de la corriente y la forma gaussiana de los picos, se puede atribuir a la formación del complejo de inclusión entre la MT y la βCD.

7.4 Referencias

- [1] A. Radi, G.. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.
- [2] J.L. Corujo-Antuña, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 421–9.
- [3] H. Bagheri, A. Afkhami, P. Hashemi, M. Ghanei, Simultaneous and sensitive determination of melatonin and dopamine with Fe₃O₄ nanoparticle-decorated reduced graphene oxide modified electrode, *RSC Adv.* 5 (2015) 21659–21669.
- [4] J. Smajdor, R. Piech, M. Pięk, B. Paczosa-Bator, Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 278–284.
- [5] A. Babaei, A.R. Taheri, I. Khani Farahani, Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 183 (2013) 265–272.
- [6] H. Zeinali, H. Bagheri, Z. Monsef-Khoshhesab, H. Khoshsafar, A. Hajian, Nanomolar simultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO₂-Co₃O₄@rGO nanocomposite, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 386–394.
- [7] W. Qu, F. Wang, S. Hu, D. Cui, Electrocatalytic properties and voltammetric determination of melatonin at a nanostructured film electrode, *Microchim. Acta.* 150 (2005) 109–114.
- [8] A. Levent, Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 21 (2012) 114–119.
- [9] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response, *Electroanalysis.* 10 (1998) 336–342.
- [10] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.

Capítulo 8. Determinación cuantitativa de la MT en muestras sintéticas

Las técnicas voltamperométricas son una buena opción en la determinación de la MT, principalmente por la rapidez para realizar determinaciones y la facilidad para manejar las muestras. A la fecha, se han realizado algunos estudios usando esta técnica, sin embargo son pocos los que han utilizado EPC [1–5]. Los trabajos en los que se modificó el EPC en busca de mejorar su sensibilidad y selectividad [4,5], implicaron una preparación laboriosa y tardada de las nanoestructuras que se emplearon en la modificación de la superficie. Por otro lado, los resultados hasta ahora han mostrados, que la β CD y las NPsAu- β CD mejora la respuesta de la corriente del EPC hacia la MT, aunado a esto, su modificación es muy sencilla y rápida. Por lo que, la modificación de los EPC con β CD o NPsAu- β CD para la determinación de la MT, mediante métodos electroquímicos, es muy conveniente.

Por todo esto, el propósito de este capítulo es la obtención de un método para la determinación de la MT mediante las técnicas de voltamperometría cíclica y diferencial de pulso usando un EPC- β CD y EPC-NPsAu modificados aplicando 5 y 15 ciclos.

8.1 Metodología

8.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se prepararan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento de realizar el experimento con los siguientes reactivos: β CD (Fluka 97 %), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70 %), HAuCl_4 (Sigma-Aldrich $\geq 99.9\%$), $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ (Sigma-Aldrich 103.2%), NaOH (Sigma-Aldrich 98.4%), grafito en polvo (AlfaAesar 99.9995%) y aceite mineral (Fluka).

8.1.2 Instrumentación

Los estudios de voltamperometría cíclica, se llevaron a cabo en un potenciostato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100 y un potenciostato DropSense conectado al software DropView 2. Utilizando una celda típica de tres electrodos: como contraelectrodo un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo un EPC modificado con NPsAu o β CD o NPsAu• β CD. Los EPC, se preparan siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al* [6] y su modificación con β CD o NPsAu• β CD se hace tal como lo describe Roa *et al.* [7], descrito a detalle en el Capítulo 4.

8.2 Resultados

8.2.1 Estudio de voltamperometría cíclica

8.2.1.1 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC

Con el objeto de observar el comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC al variar su concentración, construir una curva de calibración y obtener parámetros analíticos; se hace un estudio de voltamperometría cíclica, donde se varía la concentración de la MT. En la Figura 8.1, se muestra la familia de voltamperogramas cíclicos de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 a pH 3, a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . En los VC, se observan los dos picos de oxidación I y III a 814 y 363 mV, además del pico de reducción II a 323 mV. El pico de oxidación I, se desplaza ligeramente hacia potenciales mayores al aumentar la concentración, mientras que la intensidad de corriente de los pico incrementa.

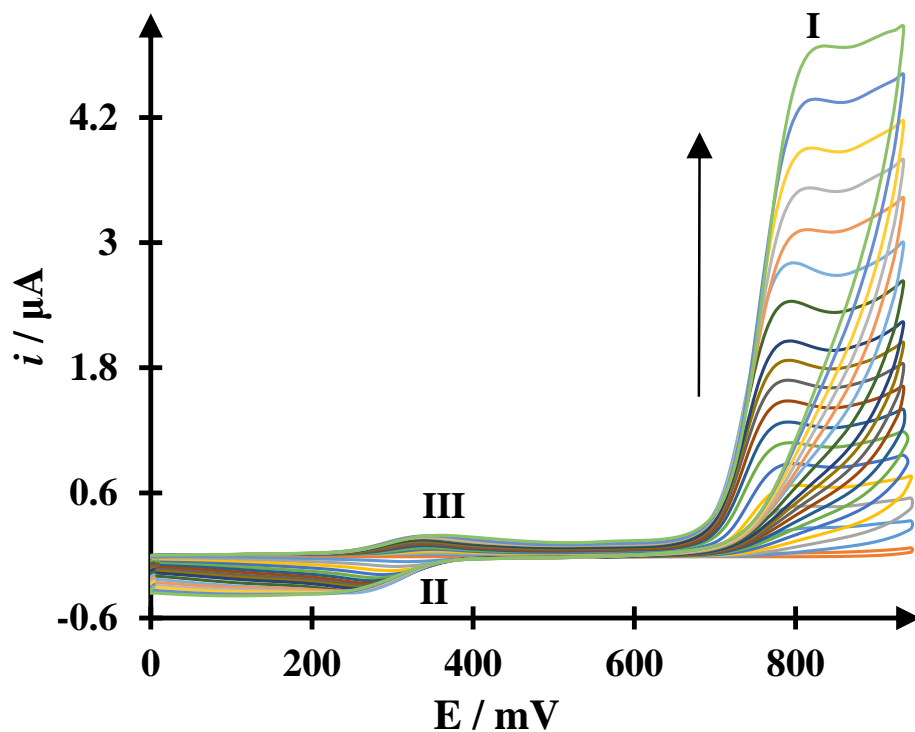


Figura 8.1. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / x mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , donde x varía de 0 a 0.12 mM.

A partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 8.1, se construye una gráfica de la i_{pa} en función de su concentración de la MT, para lo cual se usa el pico anódico I correspondiente al primer proceso de oxidación de la MT (Figura 8.2). En Figura 8.2, se observa una relación lineal de la i_{pa} en función de la $[\text{MT}]$, la expresión matemática que describe este comportamiento es:

$$i_{pa}(\mu A) = (38.9666 \pm 0.178)(\mu A \text{ mM}^{-1})[\text{MT}] - (0.082 \pm 0.011)(\mu A) \quad (8.1)$$

en donde el coeficiente de correlación, R^2 , es 0.999.

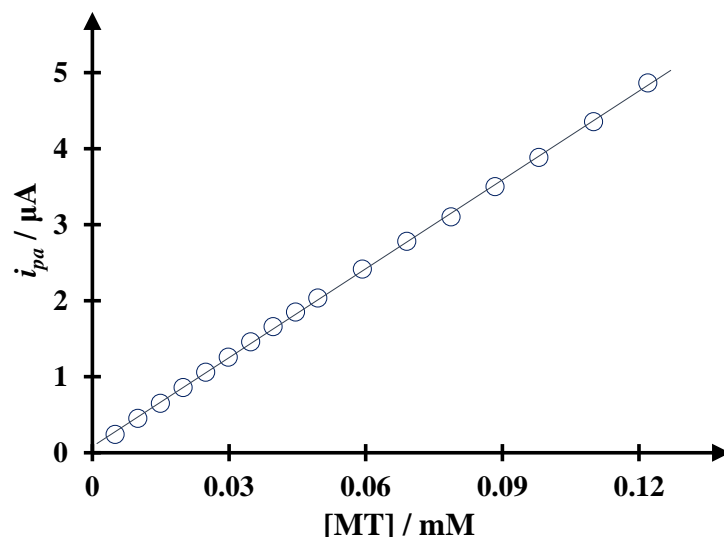


Figura 8.2. Gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la MT en 0.001 M de $HClO_4$ (pH 3), usando un EPC. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 8.1.

A partir de la curva la i_{pa} vs [MT] de la Figura 8.2, es posible conocer la concentración de la MT en diferentes muestras a pH 3. De esta forma, se tiene una curva de calibración con una sensibilidad de $m = 0.039 \mu A/\mu M$, un intervalo de linealidad, I-L, de 5 a 120 μM ; así como un límite de cuantificación $LOD = 2 \mu M$ y límite de detección de $LOQ = 7 \mu M$, obtenidos a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, de acuerdo con la IUPAC [8], respectivamente.

8.2.1.2 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC- βCD

Una vez analizado el comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC, al variar su concentración; se prosigue con el estudio de voltamperometría cíclica variando la concentración de la MT sobre un EPC- βCD aplicando 5 y 15 ciclos. En la Figura 8.3, se aprecia la familia de VC de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M $HClO_4$ a pH 3, a una velocidad de barrido de $20 mVs^{-1}$, usando un EPC- βCD modificado aplicando (a) 5 y (b) 15 ciclos. En los VC, se aprecian los dos picos de oxidación I y III en 784 y 342 mV, valores menores a los obtenidos al usar un EPC sin modificar. También se aprecia el pico de reducción II a 289 mV. El pico de oxidación I, se desplaza ligeramente hacia potenciales menores al aumentar la concentración, al contrario de

cuando se usa un EPC. La intensidad de corriente de los pico aumenta al incrementar la concentración de la MT en el sistema.

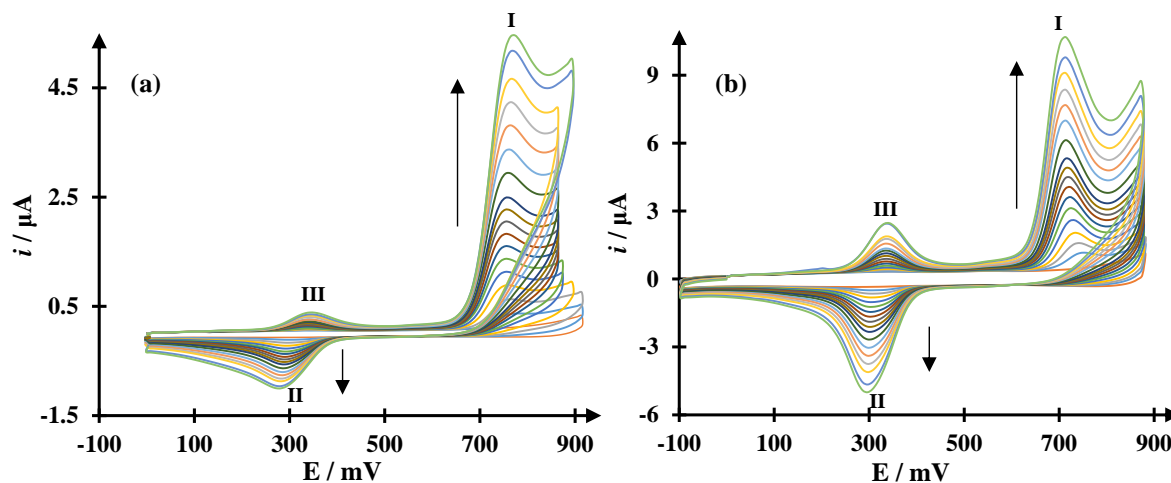


Figura 8.3. Voltamperogramas cíclicos para el sistema x mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , donde x varía de 0 a 0.12 mM; usando un EPC- β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos.

En los VC de la Figura 8.6, se observa que los picos tienen una mayor intensidad de corriente al aplicar 15 ciclos de β CD; así como una mayor definición. Cuando éstos se comparan con los VC obtenidos sobre un EPC sin modificar, la aparición de los picos se aprecia a valores de E menores al usar los EPC- β CD. Esto indica, que cuando el EPC se modifica con β CD se requiere de menor energía para oxidar a la MT y que se tiene una mayor sensibilidad del electrodo. Esto puede notarse en la Figura 8.4, donde se comparan los VC obtenidos a una concentración de 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 , usando un EPC y un EPC- β CD modificado aplicando 5 y 15 ciclos.

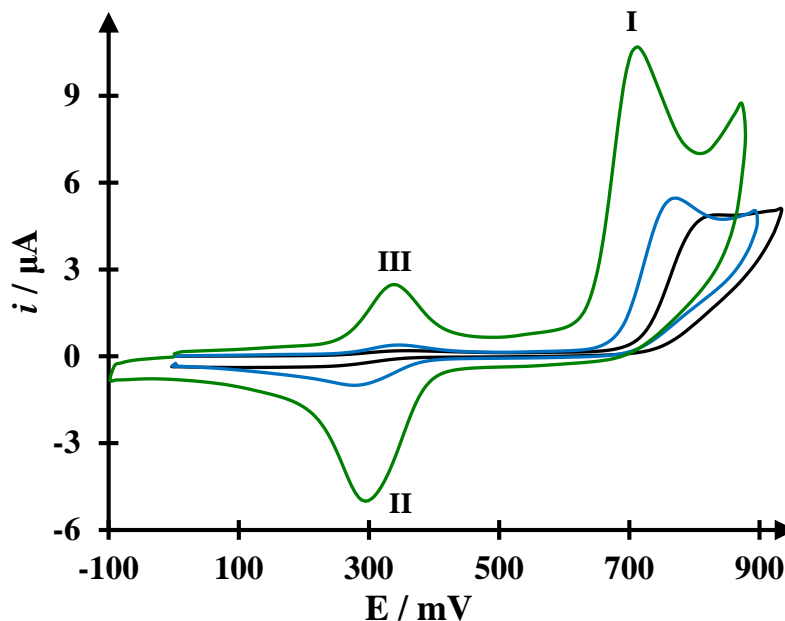


Figura 8.4. Voltamperogramas cíclicos de la MT a 0.12 mM en 0.001M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—) y EPC- β CD modificado con 5 (—) y 15 (—) ciclos.

Con los valores experimentales de los VC de la Figura 8.5, se construyeron las gráficas de la i_{pa} en función de la concentración de la MT. En las curvas i_{pa} vs [MT] de la Figura 8.6, se observa una correspondencia lineal, cuyo comportamiento se describe mediante las siguientes ecuaciones para el EPC modificado con 5 y 15 ciclos de β CD:

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = (46.295 \pm 0.331)(\mu\text{A mM}^{-1})[\text{MT}] + (0.063 \pm 0.014)(\mu\text{A}) \quad (8.2)$$

y

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = (98.890 \pm 1.330)(\mu\text{A mM}^{-1})[\text{MT}] - (0.096 \pm 0.033)(\mu\text{A}) \quad (8.3)$$

con un R^2 de 0.999 y 0.999, respectivamente.

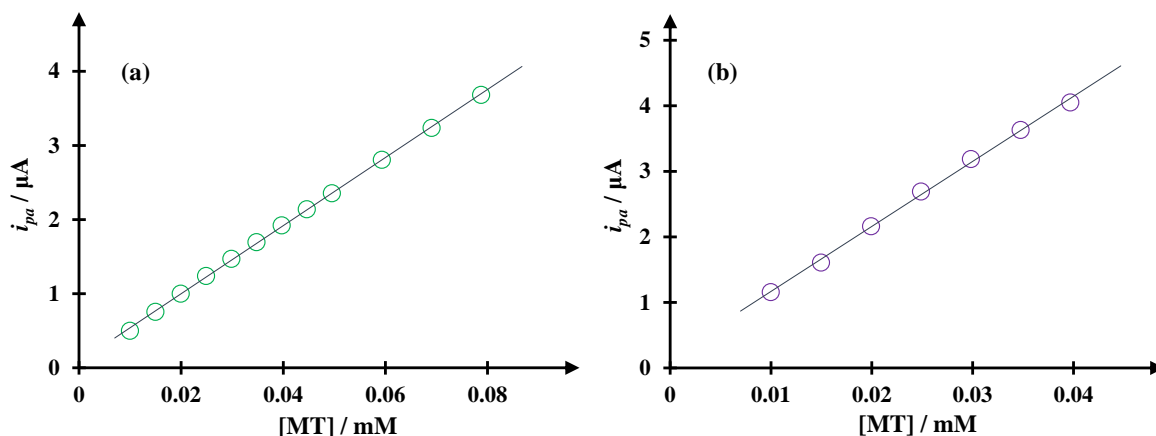


Figura 8.5. Gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la MT en 0.001 M de $HClO_4$ (pH 3), usando un EPC- β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos. Gráficas construidas a partir de los datos de la Figura 8.3.

Las curvas i_{pa} vs [MT] de la Figura 8.5, son factibles para conocer la concentración de la MT en diferentes muestras a pH 3. La Tabla 8.1, muestra los parámetros analíticos de las curvas de calibración, donde el LOD y LOQ se obtienen a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, de acuerdo con la IUPAC [8].

Tabla 8.1. Datos de obtenido de las curvas de calibración a un pH 3.

Electrodo	Número de ciclos	m / $\mu A \mu M^{-1}$	LOD* / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
EPC	0	0.039	2	7	5-120
EPC- β CD	5	0.046	2	6	5-79
	15	0.0989	1	4	5-40

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$

**LOQ: $10\sigma_{y/x} + b$

En la Tabla 8.1, se observan valores de LOD y LOQ menores al usar un EPC- β CD, así como una sensibilidad mayor al usar el EPC modificado aplicando 15 ciclos de β CD.

8.2.1.3 Estudio de VC variando la concentración de la MT sobre un EPC- NPsAu•βCD

Para analizar el comportamiento electroquímico de la MT sobre un NPsAu•βCD, al variar su concentración; se hace un estudio de voltamperometría cíclica variando la concentración de la MT sobre un NPsAu•βCD aplicando 5 y 15 ciclos. En la Figura 8.6, se presenta la familia de VC de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M de HClO₄ a pH 3, a una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹, usando un EPC-NPsAu•βCD modificado a (a) 5 y (b) 15 ciclos. En los VC, se ven los dos picos de oxidación I y III a 790 y 343 mV, potenciales aproximados a los que se tienen al usar un EPC-βCD; también se aprecia el pico de reducción II a 289 mV. El pico de oxidación I, se desplaza ligeramente hacia potenciales menores al aumentar la concentración y el número de ciclos aplicados. La intensidad de corriente de los picos aumenta al incrementar la concentración de la MT en el sistema.

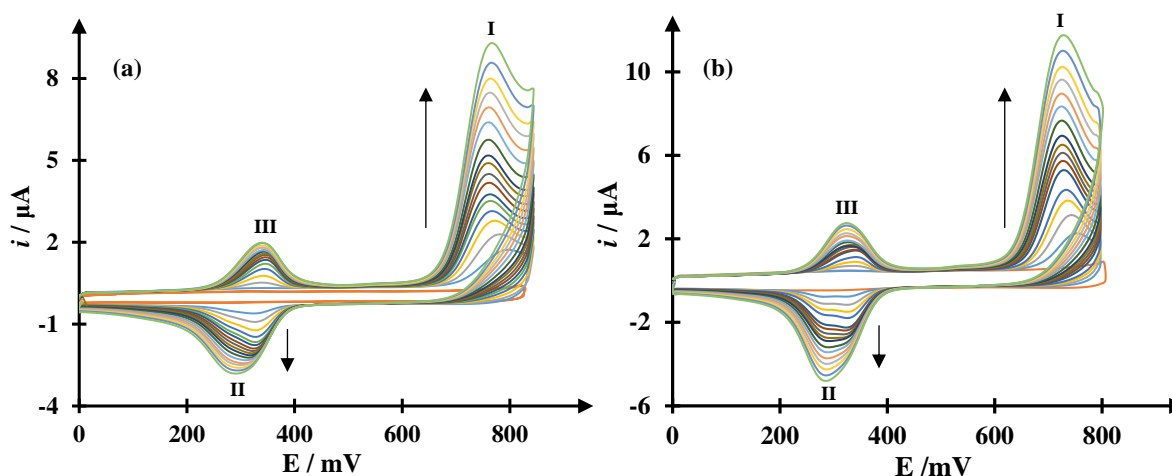


Figura 8.6. Voltamperogramas cíclicos para el sistema x mM MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a 20 mVs⁻¹, donde x varía de 0 a 0.12 mM; usando un EPC-NPsAu•βCD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos.

En los VC de la Figura 8.6, puede apreciarse que el aumento de la corriente y la definición de los picos es mayor al usar un EPC-NPsAu•βCD al aplicando 15 ciclos. Al comparar, estos VC con los obtenidos sobre un EPC sin modificar, se observa un desplazamiento de los picos de oxidación hacia potenciales menores al usar un EPC-NPsAu•βCD, por lo que la oxidación

de la MT se ve favorecida, así como la sensibilidad hacia ésta. Esto puede verse claramente en la Figura 8.7, donde se comparan los VC obtenidos a una concentración de 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 , empleando un EPC y un EPC- $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ modificado aplicando 5 y 15 ciclos.

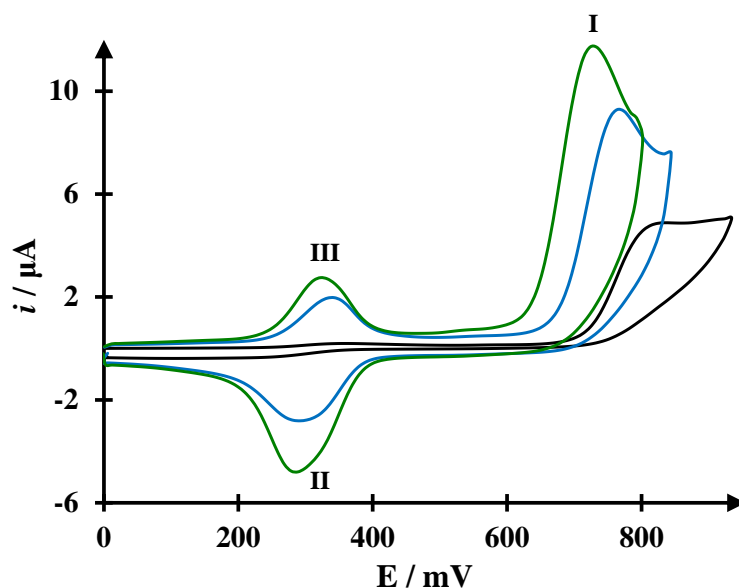


Figura 8.7. Voltamperogramas cíclicos de la MT a 0.12 mM en HClO_4 (pH 3), a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—) y EPC- $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ modificado con 5 (—) y 15 (—) ciclos.

En la Figura 8.8 se comparan los VC obtenidos a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 , sobre un EPC, $\text{EPC-}\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ y $\text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$. La comparación, muestra una mayor respuesta de la corriente y definición de los picos al usar un EPC modificado, así como el desplazamiento del pico anódico I. Estos resultados muestran, el aumento de la sensibilidad y de la selectividad hacia la MT, al usar los EPC modificados.

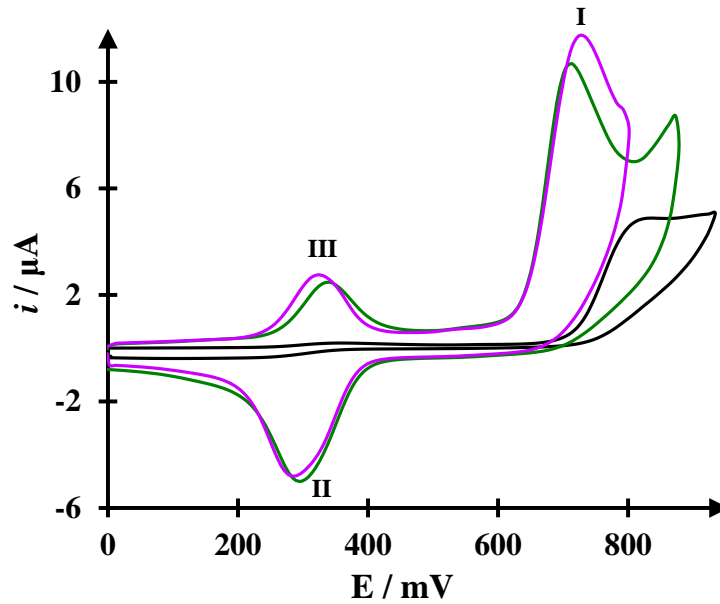


Figura 8.8. Voltamperogramas cíclicos de la MT a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—), EPC- $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—) y EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—).

A partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 8.6, se construyó una gráfica de la tendencia de la i_{pa} de la MT en función de su concentración, usando un EPC-NPsAu• βCD modificado con 5 y 15 ciclos (Figura 8.9). En las gráficas, se observa una relación lineal entre la i_{pa} y la concentración de la MT, su comportamiento se describe mediante las siguientes expresiones matemáticas para el EPC modificado con 5 y 15 ciclos de NPsAu• βCD :

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = (74.907 \pm 0.685)(\mu\text{A mM}^{-1})[MT] + (0.040 \pm 0.014)(\mu\text{A}) \quad (8.4)$$

y

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = (99.819 \pm 1.359)(\mu\text{A mM}^{-1})[MT] - (0.099 \pm 0.040)(\mu\text{A}) \quad (8.5)$$

con un R^2 de 0.999 y 0.999, respectivamente.

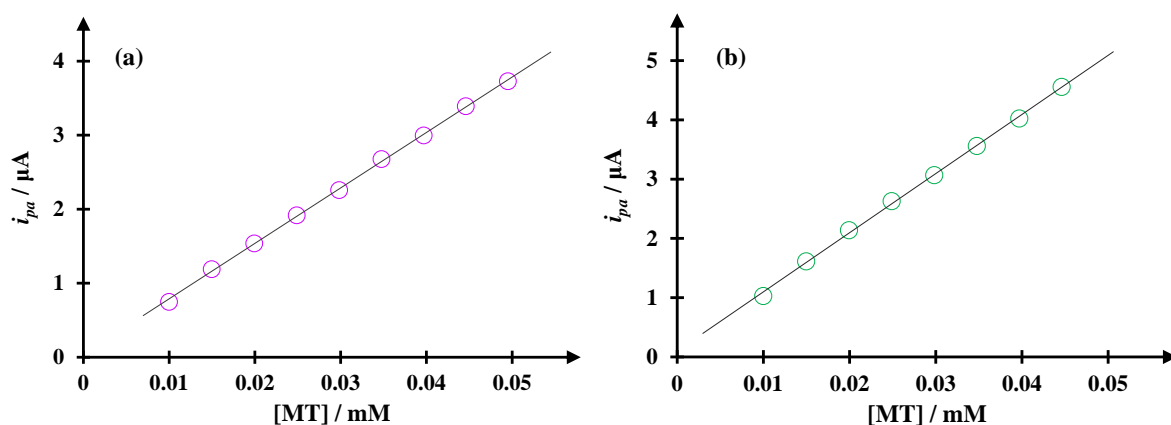


Figura 8.9. Gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), usando un EPC-NPsAu- β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos. Gráficas construidas a partir de los datos de la Figura 8.62.

A partir de las curvas i_{pa} vs [MT] de la Figura 8.9, también es posible saber la concentración de la MT en diferentes muestras a pH 3. La Tabla 8.1, muestra los resultados de la sensibilidad, así como del límite de cuantificación y detección de las curvas de calibración, obtenidos a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, de acuerdo con la IUPAC [8]. En la Tabla, se observa una mayor sensibilidad.

Tabla 8.2. Datos de obtenido de las curvas de calibración a un pH 3.

Electrodo	Número de ciclos	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	LOD* / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
EPC	0	0.039	2	7	5-120
EPC- β CD	5	0.046	2	6	5-79
	15	0.099	1	4	5-40
EPC-NPsAu- β CD	5	0.075	1	4	5-45
	15	0.100	1	4	5-45

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$

**LOQ: y $10\sigma_{y/x} + b$

8.2.2 Estudio de voltamperometría diferencial de pulso

8.2.2.1 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC

La técnica de voltamperometría diferencial de pulso, permite minimiza los efectos de la corriente capacitiva de la superficie de los diferentes EPC y obtener VDP con una corriente proporcional a la concentración de la especie electroactiva [9,10]; lo que hace posible obtener un método confiable para la determinación de la MT (Anexo B). Por lo que, se realiza un estudio de voltamperometría diferencial de pulso en donde se varia la concentración de la MT sobre un EPC. En la Figura 8.10, se muestra la familia de voltamperogramas diferenciales de pulso de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 a pH 3, a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . En la Figura, es posible ver el pico de anódico correspondiente a la oxidación de la MT en 746 mV; el cual se recorre ligeramente hacia potenciales mayores, 754 mV. La intensidad de corriente se incrementa al aumentar la concentración de la MT en el sistema.

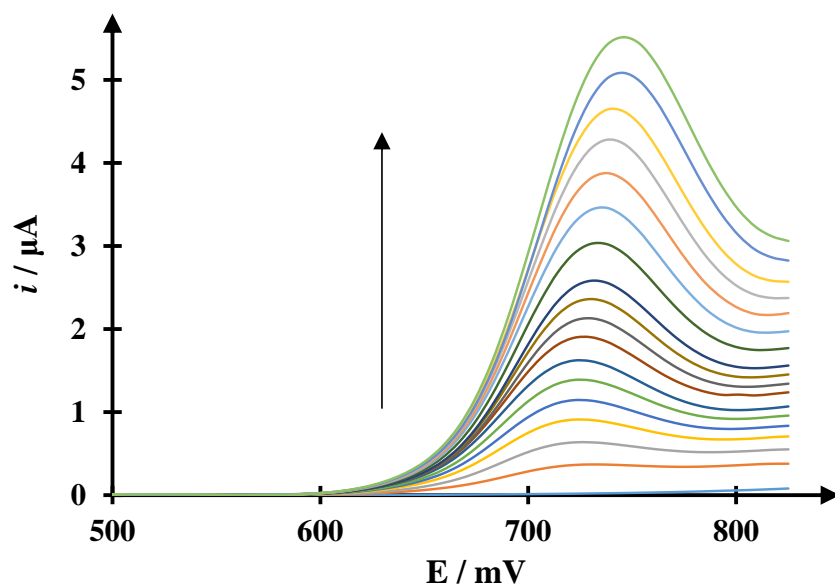


Figura 8.10. Voltamperogramas diferenciales de pulso para el sistema EPC / x mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , donde x varia de 0 a 0.12 mM.

A partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 8.10, se construyó una gráfica de la tendencia de la i de la MT en función de su concentración (Figura 8.11). En ésta se observa una relación lineal entre la i y la concentración de la MT, cuya expresión matemática es la siguiente:

$$i(\mu A) = (50.220 \pm 0.402)(\mu A \text{ mM}^{-1})[MT] - (0.108 \pm 0.011)(\mu A) \quad (8.6)$$

en donde el coeficiente de correlación, R^2 , es 0.999.

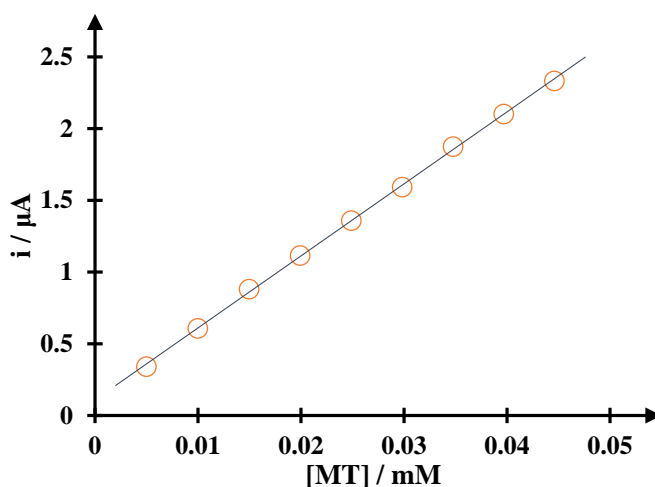


Figura 8.11. Gráfica de la i en función de la concentración de la MT en 0.001 de M HClO_4 (pH 3), usando un EPC. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 8.10.

Con la curva la i_{pa} vs $[MT]$ de la Figura 8.4, se puede saber la concentración de la MT en diferentes muestras a pH 3; por lo que, se tiene una curva de calibración con una $m = 0.050 \mu A/\mu M$, un intervalo de linealidad de 5 a 50 μM , así como un $\text{LOD} = 1 \mu M$ y $\text{LOQ} = 3 \mu M$, obtenidos a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, de acuerdo con la IUPAC [8], respectivamente.

8.2.2.2 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC- β CD

Para obtener un método analítico para su determinación usando un EPC- β CD, se hace un estudio de voltamperometría diferencial de pulso en donde se varía la concentración de la MT sobre un EPC- β CD modificado con 5 y 15 ciclos. En la Figura 8.12, se muestra la familia de voltamperogramas diferenciales de pulso de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 a pH 3, a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} . En los VDP, a concentraciones bajas es posible observar el pico de oxidación de la MT a 737 y 720 mV para 5 y 15 ciclos de β CD, respectivamente. Al aumentar la concentración de la MT en el sistema, se observa un ligero desplazamiento hacia potenciales menores de 698 y 680 mV. Además, la corriente del pico incrementa con el aumento de la concentración de la MT.

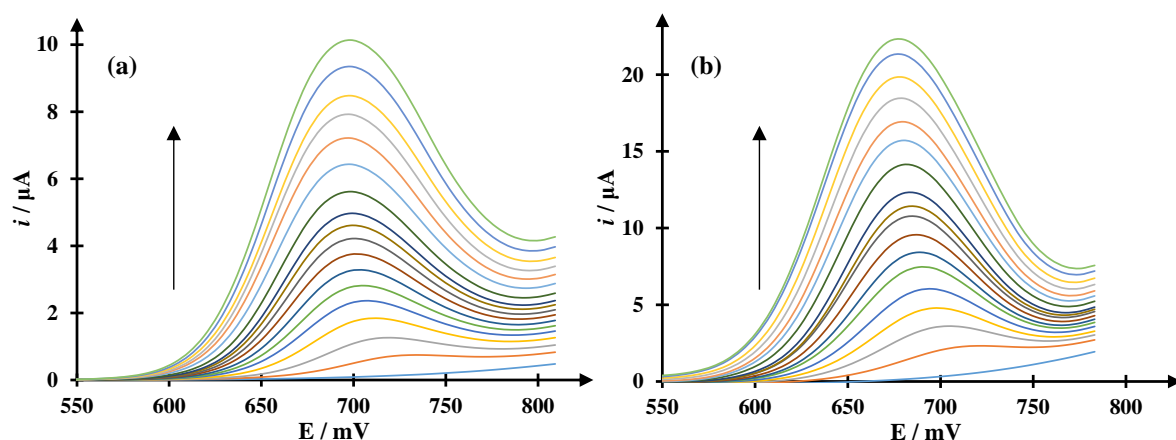


Figura 8.12. Voltamperogramas diferenciales de pulso para el sistema x mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , donde x varía de 0 a 0.12 mM; usando un EPC- β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos.

En la Figura 8.12, también se puede observar que el aumento de la corriente y definición del pico al incrementar la concentración de la MT es mayor para el EPC modificado con 15 ciclos de β CD. Al comparar los VDP con los obtenidos usando un EPC sin modificar, se ve el desplazamiento de los picos hacia potenciales menores, además de una mayor respuesta de la corriente, lo que aumenta con el número de ciclos aplicados de β CD. Esto puede observarse

en la Figura 8.13, en donde se comparan los VDP obtenidos a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 usando un EPC y un EPC- β CD modificado con 5 y 15 ciclos.

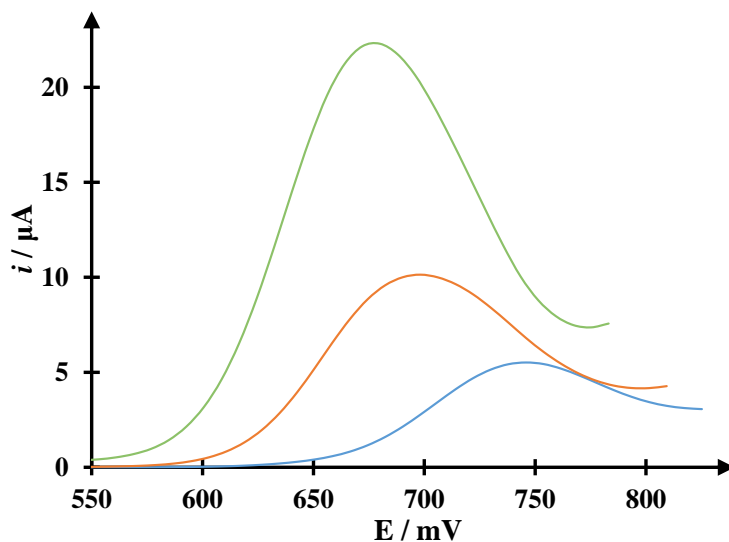


Figura 8.13. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la MT a 0.12 mM en HClO_4 (pH 3), a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—) y EPC- β CD modificado con 5 (—) y 15 (—) ciclos.

A partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 8.12, se construyó una gráfica de la tendencia de la i de la MT en función de su concentración (Figura 8.14). En las curvas, se observa una relación lineal entre la i y concentración de la MT, representada por las ecuaciones matemáticas para el EPC modificado con 5 y 15 ciclos de β CD:

$$i(\mu\text{A}) = (99.620 \pm 1.578)(\mu\text{A mM}^{-1})[\text{MT}] + (0.152 \pm 0.039)(\mu\text{A}) \quad (8.7)$$

y

$$i(\mu\text{A}) = (265.920 \pm 3.374)(\mu\text{A mM}^{-1})[\text{MT}] + (0.315 \pm 0.084)(\mu\text{A}) \quad (8.8)$$

con un R^2 de 0.998 y 0.999, respectivamente.

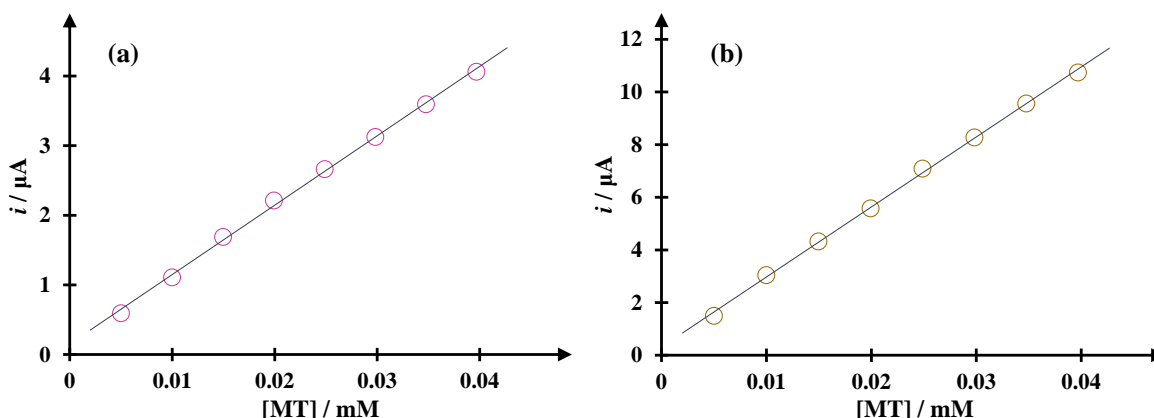


Figura 8.14. Gráfica de la i en función de la concentración de la MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), usando un EPC- β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos. Gráficas construidas a partir de los datos de la Figura 8.12.

En la Tabla 8.3, se muestran los resultados de la sensibilidad, así como del límite de cuantificación y detección de las curvas de calibración al usar un EPC y un EPC- β CD modificado con 5 y 15 ciclos.

Tabla 8.3. Datos de obtenido de las curvas de calibración a un pH 3.

Electrodo	Número de ciclos	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	LOD* / μM	LOQ** (μM)	I-L / μM
EPC	0	0.050	1	3	5-50
EPC- β CD	5	0.099	2	5	5-40
	15	0.266	1	4	5-40

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$

**LOQ: $y \ 10\sigma_{y/x} + b$

8.2.2.3 Estudio de VDP variando la concentración de la MT sobre un EPC-NPsAu• β CD

Hechos los estudios de voltamperometría diferencial de pulso usando un EPC y EPC- β CD; se continuó con los estudios empleando un EPC-NPsAu• β CD modificado con 5 y 15 ciclos. En la Figura 8.15, se presenta la familia de VDP de la MT a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 a pH 3, a una velocidad de barrido de 20

mVs^{-1} . En la VDP, a una concentración de 0.005 mM el pico de oxidación se observa en 722mV, para ambos casos. Cuando se incrementa la concentración de la MT en el sistema, el pico se desplaza hacia potenciales menores de 698 y 6750 mV para 5 y 15 ciclos, respectivamente. Con el aumento de la concentración de la MT en el sistema, la intensidad de la corriente del pico se incrementa.

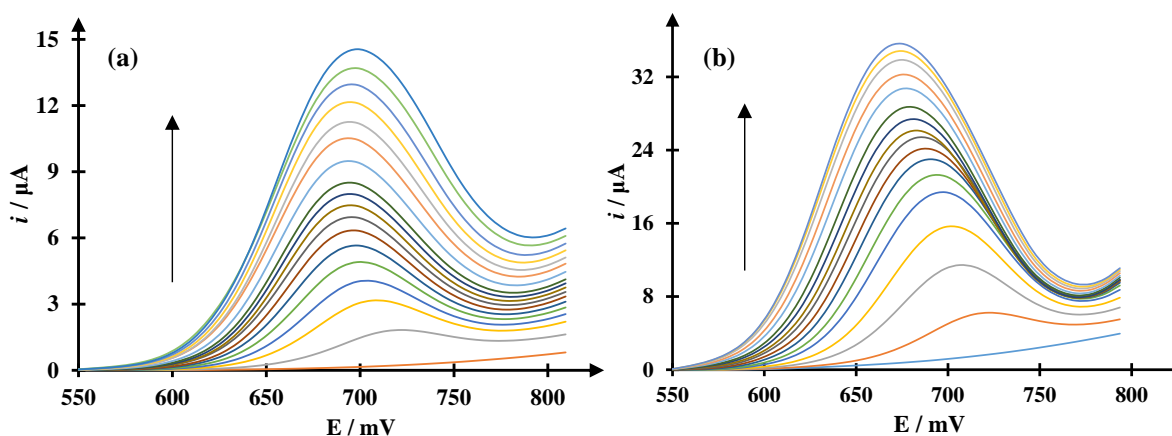


Figura 8.15. Voltamperogramas diferenciales de pulso para el sistema x mM MT en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 20 mVs^{-1} , donde x varía de 0 a 0.12 mM; usando un EPC-NPsAu• β CD modificado con (a) 5 y (b) 15 ciclos.

En la Figura 8.16, se contrastan los VDP de la MT a una concentración de 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 , obtenidos al emplear una EPC sin modificar y un EPC-NPsAu• β CD modificado con 5 y 15 ciclos. En las gráficas se observa un aumento en la intensidad de la corriente y el desplazamiento del pico de oxidación hacia potenciales menores al incrementar el número de ciclos aplicados de NPsAu• β CD.

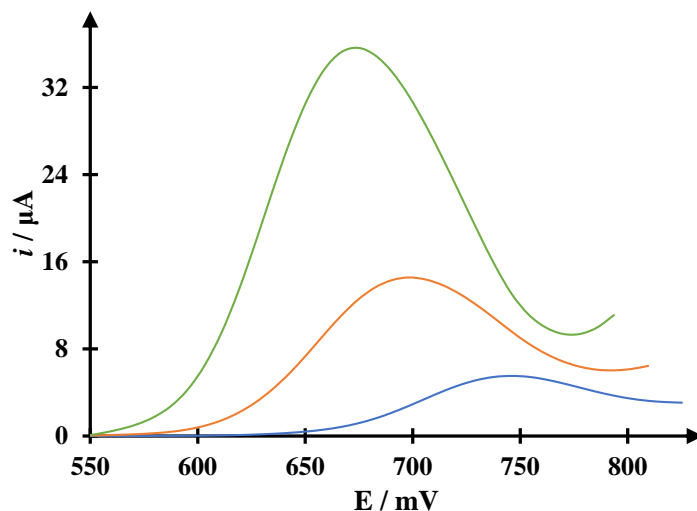


Figura 8.16. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la MT a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—) y EPC- βCD modificado con 5 (—) y 15 (—) ciclos

La Figura 8.17, expone los VDP obtenidos a una concentración de 0.12 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 al usar un EPC, EPC- $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ y EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$. En los VDP, el pico de oxidación se presenta a un potencial menor cuando se utiliza un EPC modificado; además de mostrar un aumento en la intensidad de corriente, el cual es mayor para el EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$.

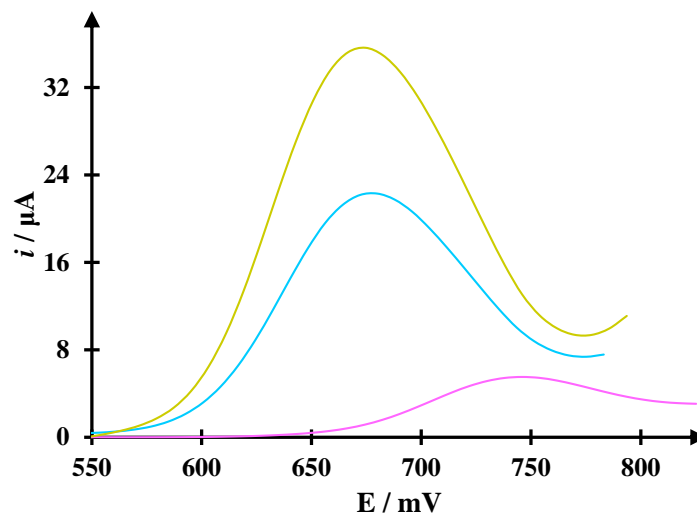


Figura 8.17. VDP de la MT a 0.12 mM en 0.001 M de HClO_4 (pH3) a 20 mVs^{-1} , usando un EPC (—), un EPC- $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—) y un EPC-NPsAu• $\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ (—).

A partir de los VDP de la Figura 8.15, se construyó una gráfica de la tendencia de la i del pico de oxidación de la MT en función de su concentración (Figura 8.18). En ésta se observa una dependencia lineal entre la i y la concentración de la MT, cuya relación matemática es la siguiente, para el EPC-NPsAu• β CD_(5 ciclos) y EPC-NPsAu• β CD_(15 ciclos):

$$i(\mu A) = (157.010 \pm 2.817)(\mu A \text{ mM}^{-1})[MT] + (0.259 \pm 0.083)(\mu A) \quad (8.9)$$

y

$$i(\mu A) = (664.910 \pm 10.349)(\mu A \text{ mM}^{-1})[MT] + (0.207 \pm 0.093)(\mu A) \quad (8.10)$$

con un R^2 de 0.998 y 0.999, respectivamente.

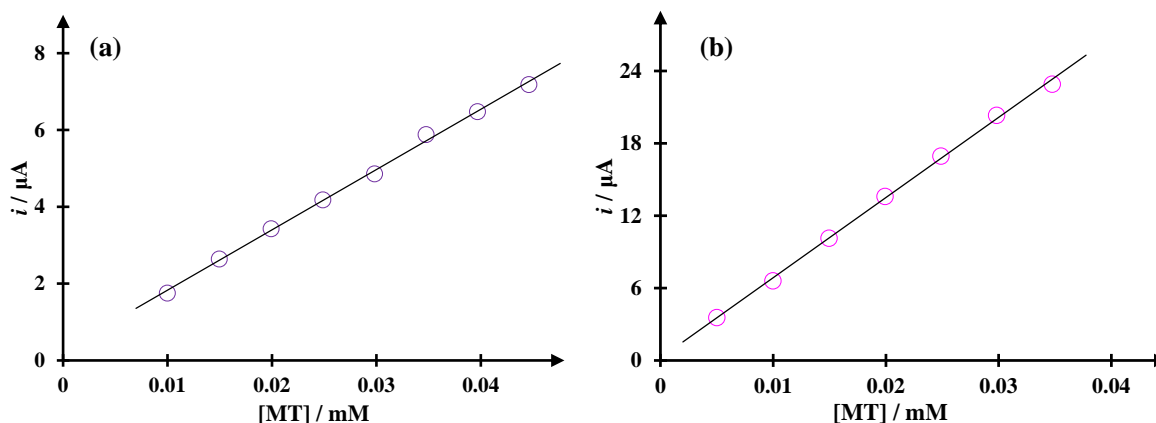


Figura 8.18. Gráfica de la i en función de la concentración de la MT en 0.001 M de $HClO_4$ (pH 3), usando un EPC-NPsAu• β CD modificado con 5 y 15 ciclos. Gráficas construidas a partir de los datos de la Figura 8.15.

Con el objeto de comparar los parámetros analíticos, obtenidos mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso utilizando los diferentes EPC, La Tabla 8.4, presenta los valores de la sensibilidad, los límites de cuantificación y detección y el intervalo de linealidad de la curva de calibración.

Tabla 8.4. Datos de obtenido de las curvas de calibración a un pH 3.

Electrodo	Número de ciclos	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	LOD* / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
EPC	0	0.050	1	3	5-50
EPC- β CD	5	0.099	2	5	5-40
	15	0.266	1	4	5-40
EPC-NPsAu- β CD	5	0.157	2	6	5-40
	15	0.664	1	5	5-35

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$ **LOQ: $y \ 10\sigma_{y/x} + b$

8.3 Conclusiones

Mediante las técnicas de voltamperometría cíclica y diferencial de pulso, se obtuvieron distintas curvas de calibración para la cuantificación de la MT con una sensibilidad mayor y límites de cuantificación y detección menores a los obtenidos mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis. Las curvas de calibración, muestran un aumento de la sensibilidad con la siguiente tendencia de acuerdo al electrodo empleado: $\text{EPC} < \text{EPC-}\beta\text{CD}_{(5 \text{ ciclos})} < \text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}_{(5 \text{ ciclos})} < \text{EPC-}\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})} < \text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$. Al utilizar la técnica de voltamperometría diferencial de pulso, la sensibilidad es mayor en comparación de la obtenida mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Finalmente, a partir de la modificación del EPC con las $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$, se tiene una sensibilidad mayor ($0.664 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$) a la obtenida por Levent *et al.* [11] ($0.4367 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$) con un electrodo de diamante dopado. Éste valor de sensibilidad, es el más alto reportado en la literatura hasta la fecha. Los resultados muestran que dentro de los métodos electroquímicos, los $\text{EPC-NPsAu}\cdot\beta\text{CD}_{(15 \text{ ciclos})}$ son una buena alternativa en la determinación de la MT en muestras sintéticas.

8.4 Referencias

- [1] A. Radi, G.. Bekhiet, Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45 (1998) 275–279.
- [2] J.L. Corujo-Antuña, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 421–9.
- [3] J.L. Corujo-Antuña, S. Martínez-Montequín, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Sensitive adsorptive stripping voltammetric methodologies for the determination of melatonin in biological fluids, *Electroanalysis.* 15 (2003) 773–778.
- [4] H. Bagheri, A. Afkhami, P. Hashemi, M. Ghanei, Simultaneous and sensitive determination of melatonin and dopamine with Fe₃O₄ nanoparticle-decorated reduced graphene oxide modified electrode, *RSC Adv.* 5 (2015) 21659–21669.
- [5] E. Molaakbari, A. Mostafavi, H. Beitollahi, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine, *Sensors Actuators, B Chem.* 208 (2015) 195–203.
- [6] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response, *Electroanalysis.* 10 (1998) 336–342.
- [7] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.
- [8] J.N. Miller, J.C. Miller, Estadística y quimiometría para química analítica, Cuarta edi, Prentice Hall, Pearson EDucación, S.A. Madrid, 2002.
- [9] J. Wang, Analytical Electrochemistry, Third Edit, John Wiley & Sons, 2006.
- [10] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods : fundamentals and applications, 2da. edici, JOHN WILEY & SONS, IN, United States of America, 2001.
- [11] A. Levent, Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 21 (2012) 114–119.

Capítulo 9. Estudio electroquímico de la levodopa y melatonina

La levodopa L-3,4-dihidroxifenilalanina, LD, es un neurotransmisor vital para el organismo humano, ya que es precursor metabólico de importantes neurotransmisores como la dopamina y la norepinefrina, entre otros. Es producida en el cerebro y se encuentra naturalmente en algunos alimentos como habas, verdolagas, plátano [1,2]. Actualmente la LD, se utiliza en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson por su eficacia [3]. La producción de la LD está íntimamente ligada con la producción de la Melatonina, MT, ambas coexisten en el mismo sistema biológico [1]. Debido a la importancia que tiene el conocer los niveles de LD y MT en pacientes con padecimientos neurodegenerativos, para administrarla la dosis correcta y dar seguimiento al tratamiento de dichas enfermedades, es indispensable contar con un método eficiente y las técnicas voltamperométricas son una alternativa.

Debido a que la MT y LD se oxidan a potenciales muy cercanos cuando se emplea un EPC, provocando el traslape de las señales; se propone construir un EPC- β CD que permita detectar MT en presencia de LD, aprovechando la propiedad de forman complejos de inclusión que tiene la β CD [4]. Es por ello, que en este trabajo se realizó un estudio del comportamiento electroquímico de la LD, mediante la técnica de voltamperometría cíclica, sobre un EPC sin modificar y modificado con la electropolimerización de la β CD. Además, se estudia el comportamiento de la MT en presencia de la LD, con el propósito de obtener un método que permita la detección de las señales de los neurotransmisores simultáneamente.

9.1 Metodología

9.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se prepararan a partir de reactivos grado analítico, usando agua desionizada con una resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, libre de materia orgánica, obtenida en un equipo Milli-Q Modelo Integral 5 (110V/60HZ-CR). Las soluciones se preparan al momento

de realizar el experimento con los siguientes reactivos: β CD (Fluka 97 %), HClO_4 (Sigma-Aldrich 70 %), HAuCl_4 (Sigma-Aldrich $\geq 99.9\%$), $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ (Sigma-Aldrich 103.2%), NaOH (Sigma-Aldrich 98.4%), grafito en polvo (Alfa Aesar 99.9995%), aceite mineral (Fluka) y levodopa (Sigma-Aldrich $\geq 98\%$).

9.1.2 Instrumentación

Los estudios de voltamperometría cíclica, se llevaron a cabo en un potenciostato-galvanostato marca AUTOLAB PGSTAT 100 y un potenciostato DropSense conectado al software DropView 2. Utilizando una celda típica de tres electrodos: como contraelectrodo un alambre de platino (MW-1033), como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl 3 M de NaCl (MF-1033) y como electrodo de trabajo un EPC modificado con NPsAu o βCD o $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$. Los EPC, se preparan siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al* [5] y su modificación con βCD o $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$ se hace tal como lo realizaron Roa *et al.* [6], descrito a detalle en el Capítulo 4.

9.2 Resultados

9.2.1 Estudio de voltamperometría cíclica usando un EPC

9.2.1.1 Estudio de VC de la LD variando la velocidad sobre un EPC

Con el propósito de conocer el comportamiento electroquímico de la LD al usar un EPC, se hizo un estudio voltamperométrico. La Figura 9.1 muestra los VC para el sistema EPC / 0.13 mM de LD en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 20 a 350 mVs^{-1} . El primer voltamperograma cíclico obtenido a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} , presenta un pico de oxidación en 691 mV y uno de reducción en 348 mV, lo que da una separación de picos ΔE superior a 60 mV, por lo que se tiene un proceso no reversible.

Al incrementar la velocidad de barrido, el pico de oxidación presenta un pequeño desplazamiento hacia potenciales mayores de 801 mV; mientras que el pico de reducción se

mueve ligeramente hacia potenciales menores 250 mV. Con el aumento de la velocidad de barrido, la corriente de los picos se incrementa.

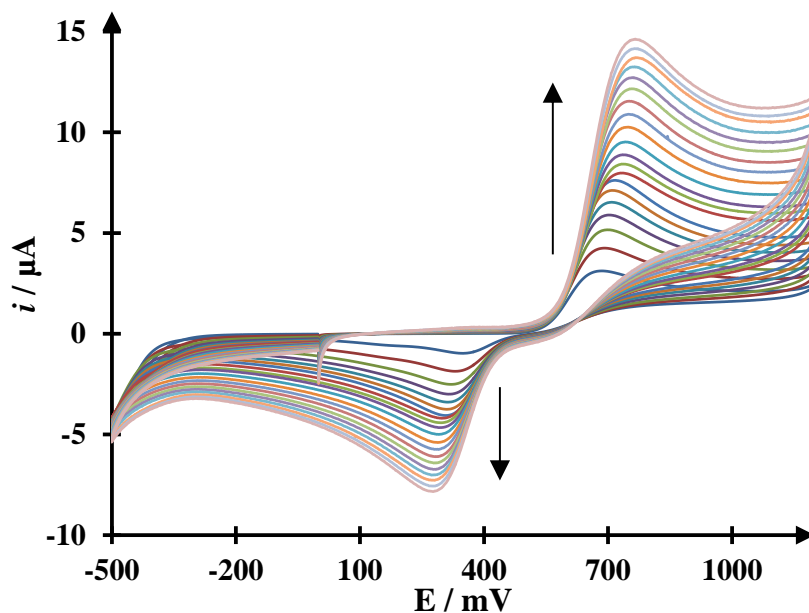


Figura 9.1. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / 0.13 mM LD en HClO₄ (pH 3) a diferentes velocidades de barrido (20- 350 mVs⁻¹).

A partir de los VC de la Figura 9.1 obtenidos sobre un EPC, se analiza la tendencia de la i_{pa} del proceso de oxidación de la LD en función de la $v^{1/2}$, la cual se muestra en la Figura 9.2, el ajuste lineal está representada por la ecuación matemática:

$$i_{pa}(\mu A) = (0.801 \pm 0.003)(\mu A mV^{-\frac{1}{2}} s^{\frac{1}{2}})v^{\frac{1}{2}} + (0.793 \pm 0.045)(A\mu) \quad (9.1)$$

donde R^2 es 0.999.

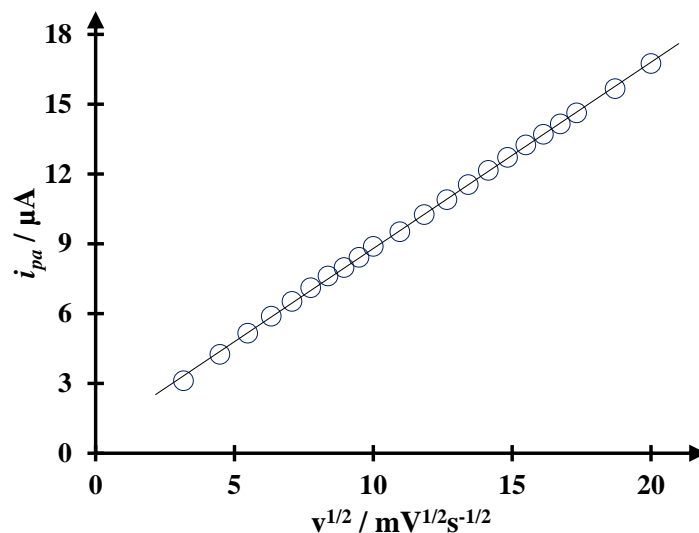


Figura 9.2. Gráfica de la i_{ap} en función de $v^{1/2}$, obtenida de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 9.1.

Debido a que la gráfica de la Figura 9.2 presenta una relación lineal de la i con respecto de la $v^{1/2}$, el transporte de masa en el proceso de oxidación de la LD está controlado por la difusión de la especie, de acuerdo a la ecuación Randles–Sevcik.

9.2.1.2 Estudio de VC de la LD variando su concentración sobre un EPC

Para observar el comportamiento electroquímico de la LD sobre un EPC en función de la concentración y construir una curva de calibración que permita su determinación, se hace un estudio de voltamperometría cíclica donde se varía su concentración, mostrado en la Figura 9.3, en un intervalo de 0 a 0.15 mM en 0.001 M de HClO_4 a pH 3, a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} . En los VC se observa la respuesta electroquímica característica de la LD, con un pico de oxidación en 708 mV y un pico de reducción en 300 mV. La intensidad de corriente de los pico aumenta al incrementar la concentración de la LD en el sistema.

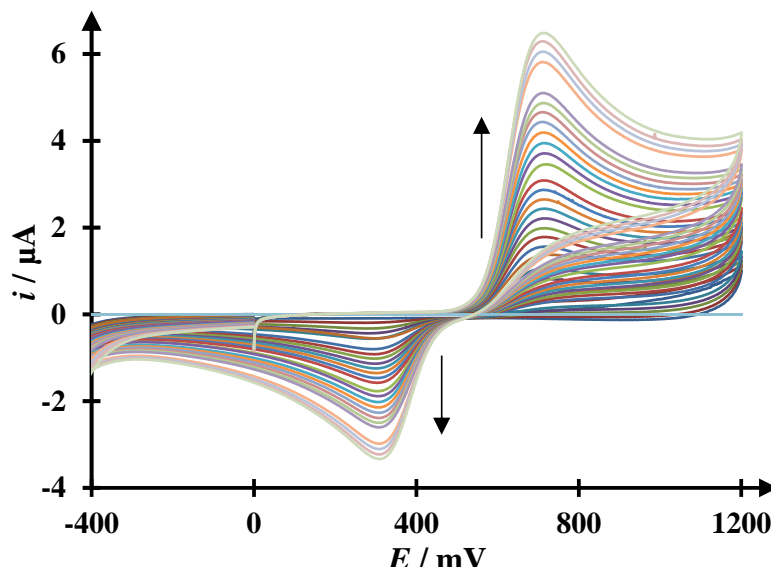


Figura 9.3. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC / x mM LD en 0.001 M de HClO_4 (pH 3) a 50 mVs^{-1} , donde x varia de 0 a 0.15 mM.

De los voltamperogramas cíclicos de la Figura 9.3, se construye una gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la LD (Figura 9.4), en la cual se observa una relación lineal, la expresión matemática que describe este comportamiento es la siguiente:

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = (44.575 \pm 0.345)(\mu\text{A mM}^{-1})[MT] + (0.010 \pm 0.005)(\mu\text{A}) \quad (9.2)$$

en donde R^2 es 0.999.

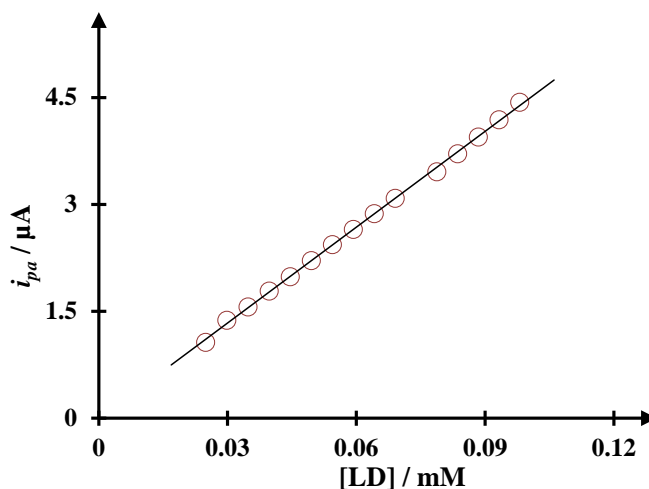


Figura 9.4. Gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la LD en 0.001 M de HClO_4 (pH 3), usando un EPC. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 9.3.

A partir de la curva de calibración i_{pa} vs [LD] de la Figura 9.4, es posible conocer la concentración de la LD en diferentes muestras a pH 3, con una sensibilidad de $0.044 \mu\text{A}/\mu\text{M}$, un LOD de $2 \mu\text{M}$, un LOQ de $10 \mu\text{M}$ obtenidos a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, respectivamente, en un intervalo de linealidad de 30 a $100 \mu\text{M}$, de acuerdo con la IUPAC [7].

9.2.1.3 Comportamiento electroquímico de la MT y LD sobre un EPC

Con el objeto de observar el comportamiento electroquímico de la LD y la MT, en la Figura 9.5 se comparan los VC para los sistemas: EPC/ 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (.....) y EPC/ 0.07 mM de LD en 0.001 M de HClO_4 (---), a 50 mVs^{-1} . En los VC, se observan los picos de oxidación en 730 y 650 y los picos de reducción en 310 y 330 mV, para la MT y la LD, respectivamente, la separación de los picos de oxidación es de 80 mV, esta cercanía, puede ocasionar el traslape de señales, impidiendo la determinación simultánea de ambos neurotransmisores.

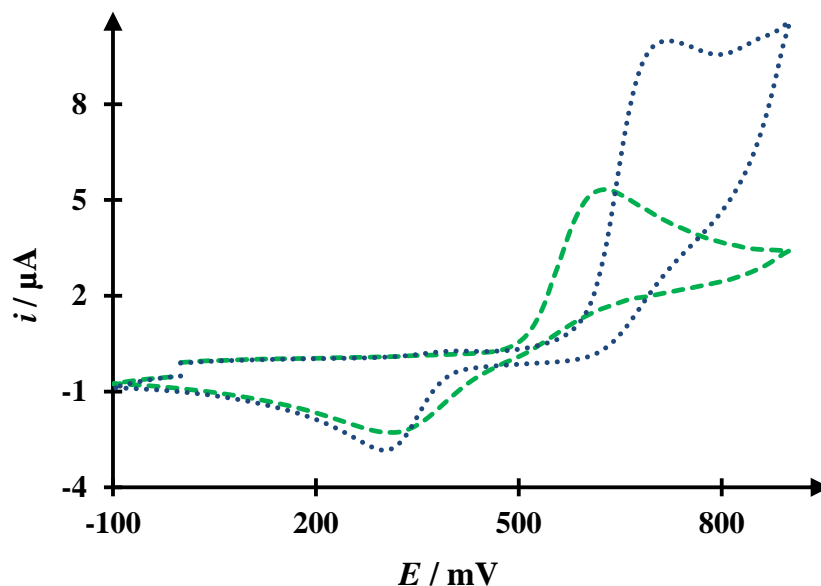


Figura 9.5. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas: EPC/ 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 , pH 3 (.....) y EPC/ 0.07 mM de LD en 0.001 M de HClO_4 , pH3 (---), a 50 mVs^{-1} .

Para comprobar si hay un traslape de los picos, se obtuvo el voltamperograma cíclico para el sistema EPC/ 0.07 mM de LD y 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a 50 mVs⁻¹, el cual se presenta en la Figura 9.6. El VC muestra un sólo pico de oxidación en 700 mV y de reducción en 300 mV, comprobando el traslape de los picos.

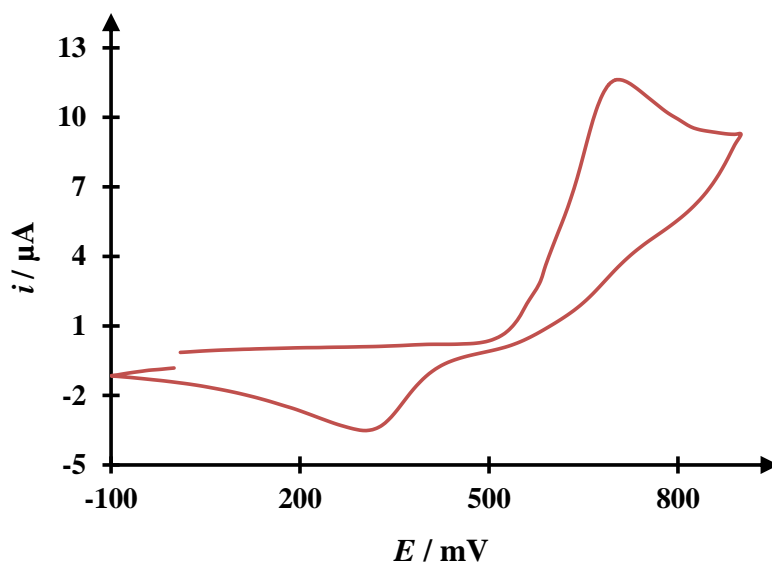


Figura 9.6. Voltamperograma cíclico del sistema EPC/ 0.07 mM de LD y 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a 50 mVs⁻¹.

Los resultados muestran, que es posible realizar determinaciones voltamperométricas de la LD usando un EPC; no obstante, la determinación simultánea de la LD y la MT no es posible, debido al traslape de los picos, por lo que se esperaría que al modificar el electrodos con βCD, la separación de los picos se incremente. A continuación, se muestran los estudios de voltamperometría cíclica realizados sobre un EPC -βCD.

9.2.2 Estudio de voltamperometría cíclica usando un EPC-βCD

9.2.2.1 Estudio de VC de la LD variando la velocidad sobre un EPC-βCD

Para conocer el comportamiento electroquímico de la LD sobre un EPC-βCD, se realiza un estudio de voltamperometría cíclica para el sistema 0.13 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3), a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 20 a 350 mVs⁻¹, usando un

EPC- β CD modificado con 10 ciclos. Este estudio se muestra en la Figura 9.7, en donde a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} , el pico de oxidación aparece en 530 mV y el de reducción en 490 mV . Al aumentar la velocidad de barrido, el pico de oxidación se mueve ligeramente hacia un potencial mayor de 580 mV ; mientras que el pico de reducción se mueve a hacia un potencial menor 360 mV y la corriente de los picos se incrementa. También se puede observar, que a velocidades de barrido bajas la separación de los picos es menor a 60 mV ; sin embargo al aumenta la velocidad de barrido esta separación aumenta considerablemente, por lo que el proceso redox de la LD se vuelve más reversible cuando se usa un EPC- β CD.

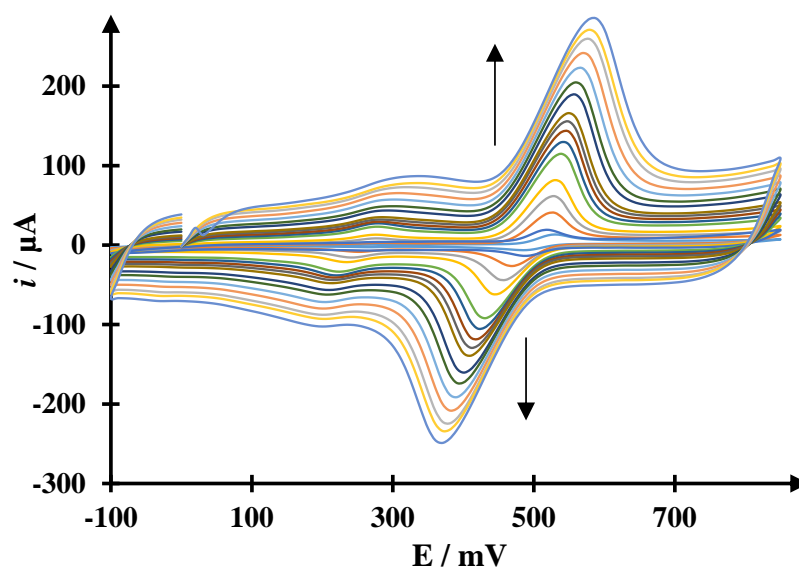


Figura 9.7. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC- β CD / 0.2 mM LD en HClO_4 ($\text{pH } 3$) a diferentes velocidades de barrido ($20\text{-}350 \text{ mVs}^{-1}$).

Debido a que en los VC de la Figura 9.7, los picos presentan una forma gaussiana, el comportamiento de la corriente del pico de oxidación, se analiza a través de la tendencia del $\log(i_{pa})$ en función de $\log(v)$. De esta forma, es posible saber si el proceso de oxidación de la LD está controlado únicamente por difusión o existe un proceso de adsorción presente. La Figura 9.8, muestra la gráfica del $\log(i_{pa})$ vs. $\log(v)$, cuando se emplea un EPC- β CD_(10 ciclos).

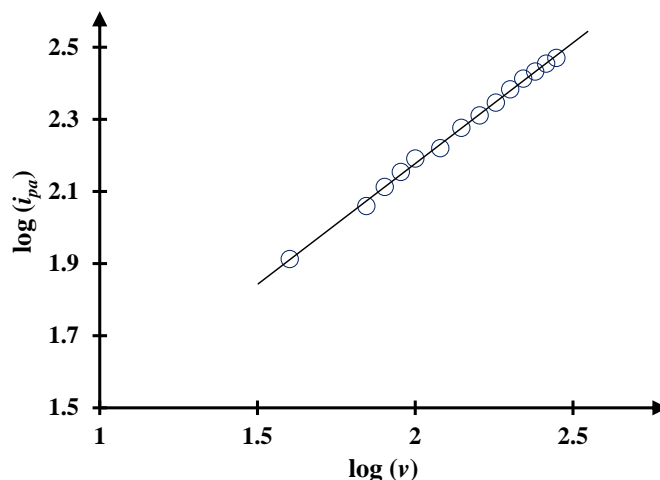


Figura 9.8. Gráfica del $\log(i_{pa})$ en función del $\log(v)$, correspondiente al proceso de oxidación de la LD usando un EPC- β CD_(10 ciclos). Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 9.7.

La curva de la Figura 9.8, presentan una relación lineal del $\log(i_{pa})$ con respecto del $\log(v)$, cuya expresión matemática es la siguiente:

$$\log i_{pa} = (0.690 \pm 0.010) \log v + (0.794 \pm 0.021) \quad (9.3)$$

La pendiente de la ecuación de 0.690 ± 0.010 , indica que la oxidación de la LD es un proceso mixto, mayormente controlado por la difusión de la especie.

Para poder observar las diferencia del comportamiento electroquímico de la LD al usar un EPC sin modificar y modificado, en la Figura 9.9, se comparan los VC de la LD 0.13 mM en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a una velocidad de 50 mVs⁻¹, usando un EPC (—) y EPC- β CD_(10 ciclos) (—). El VC obtenido sobre un EPC- β CD_(10 ciclos), muestra una corriente capacitiva mucho mayor a la del VC obtenido sobre un EPC, lo que indica la formación de una película sobre la superficie del electrodo. El VC del EPC- β CD_(10 ciclos), presenta un pico de oxidación y reducción con una corriente 2 y 3 veces mayor a la de los picos del VC del EPC, por lo que el EPC- β CD_(10 ciclos) aumenta la señal de respuesta. Además, al emplear el EPC- β CD_(10 ciclos), el pico de oxidación se desplaza hacia potenciales menores y el de reducción hacia potenciales mayores, por lo que se tiene una separación de 30 mV, a diferencia de los picos del VC del EPC que tiene una separación de 374 mV, esto muestra que la modificación del EPC con β CD favorece la reacción redox de la LD.

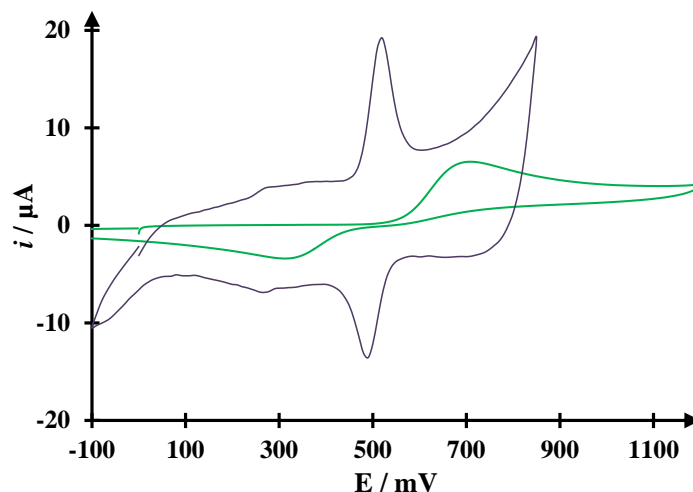


Figura 9.9. Voltamperogramas cíclicos para los sistemas EPC (—) y EPC-βCD (—) /0.07 mM de LD en 0.001 M de HClO₄ (pH3), a 50 mVs⁻¹.

9.2.2.2 Estudio de VC de la LD variando su concentración sobre un EPC-βCD

Para seguir con el estudio del comportamiento electroquímico de la LD sobre un EPC-βCD, se hace un estudio de voltamperometría cíclica para el sistema EPC-βCD / de 0.015 a 0.15 mM de LD en HClO₄ (pH 3), a una velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹, que se muestra en la Figura 9.10. Los VC, presenta un pico de oxidación y reducción en 530 y 490 mV, respectivamente, cuya corriente aumenta conforme se adiciona LD al sistema.

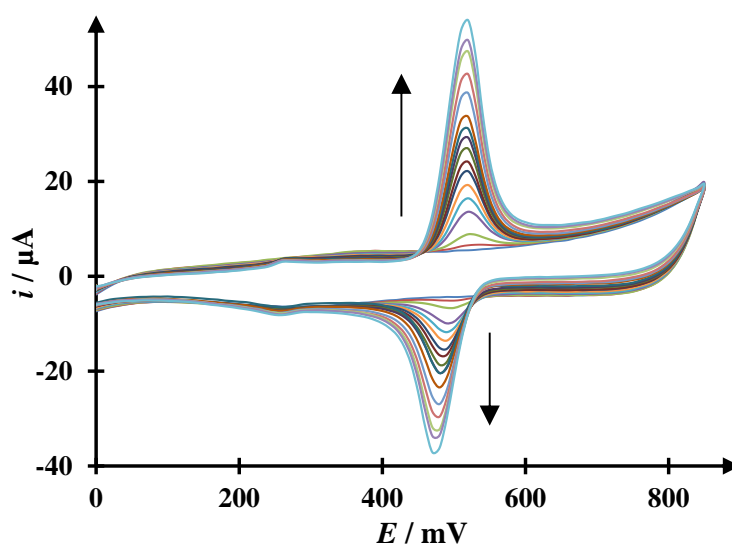


Figura 9.10. Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC-βCD / x mM LD en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a 50 mVs⁻¹, donde x varía de 0 a 0.15 mM.

Con los valores experimentales de los VC de la Figura 9.10, se construye las gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la LD. En la curva i_{pa} vs [LD] de la Figura 9.11, se observa una correspondencia lineal, cuyo comportamiento se describe mediante la siguiente ecuación:

$$i_{pa}(\mu A) = (433.410 \pm 5.505)(\mu A \text{ mM}^{-1})[MT] + (0.209 \pm 0.041)(\mu A) \quad (9.4)$$

con un R^2 de 0.999.

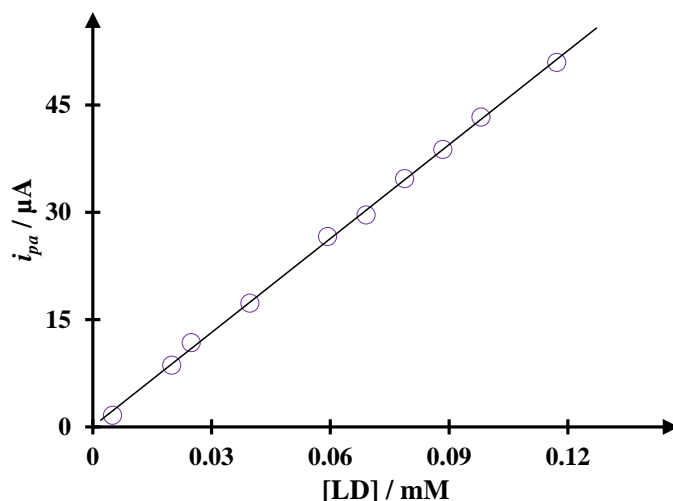


Figura 9.11. Gráfica de la i_{pa} en función de la concentración de la LD en 0.001 M de $HClO_4$ (pH 3), usando un EPC- β CD. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 9.9.

La curva de la i_{pa} vs [LD] de la Figura 9.11, pueden empleando para conocer la concentración de la LD en diferentes muestras a pH 3. La Tabla 9.1, muestra los parámetros analíticos de las curvas de calibración para la detección de la LD usando un EPC y un EPC- β CD_(10 ciclos), obtenidos a partir de $3\sigma_{y/x} + b$ y $10\sigma_{y/x} + b$, de acuerdo con la IUPAC [7]. También se muestran los parámetros analíticos de las curvas de calibración para detección de MT utilizando un EPC y un EPC- β CD_(10 ciclos).

Tabla 9.1. Datos obtenidos de las curvas de calibración de la LD a un pH 3.

NT	Electrodos	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	LOD * / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
LD	EPC	0.044	2	10	20-100
	EPC-BCD _(10 ciclos)	0.433	4	12	5-117
MT	EPC	0.039	2	7	5-120
	EPC-BCD _(10 ciclos)	0.074	2	5	5-60

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$

**LOQ: $10\sigma_{y/x} + b$

9.2.2.3 Comportamiento electroquímico de la MT y LD sobre un EPC

Con el propósito de observar las diferencias en el comportamiento electroquímico de la LD y la MT sobre un EPC- $\beta\text{CD}_{(10 \text{ ciclos})}$, en la Figura 9.12 se comparan los VC para los sistemas: EPC- $\beta\text{CD}_{(10 \text{ ciclos})}$ / 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO_4 (·····) y EPC- $\beta\text{CD}_{(10 \text{ ciclos})}$ / 0.7 mM de LD en 0.001 M de HClO_4 (— —), a 50 mVs^{-1} . En los VC, se observan los picos de oxidación en 720 y 550 y los picos de reducción en 350 y 510 mV, para la MT y la LD, respectivamente. De esta forma, la separación entre los picos de oxidación y reducción de 180 y 200 mV, respectivamente; sugieren que es posible la determinación simultánea de ambos neurotransmisores al emplear un EPC- βCD .

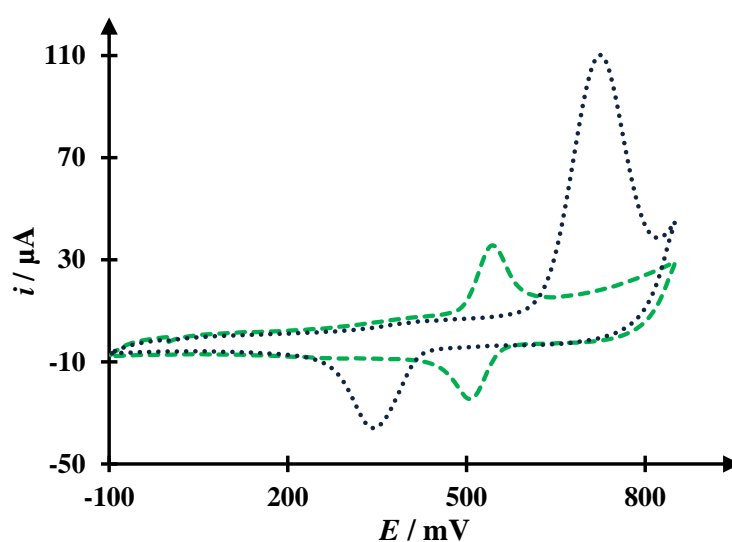


Figura 9.12. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas: EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.07 mM de MT en 0.001 M de HClO₄, pH 3 (·····) y EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.07 mM de LD en 0.001 M de HClO₄, pH 3 (—), a 50 mVs⁻¹.

Para comprobar la selectividad del EPC- β CD_(10 ciclos), en la Figura 9.13 se presenta el voltamperograma cíclico obtenido para un sistema que contiene ambos neurotransmisores simultáneamente: EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.07 mM de MT y 0.07 de LD en 0.001 M de HClO₄ (pH3). En el VC, es posible distinguir los picos de oxidación y reducción correspondientes a la MT y la LD, corroborando la selectividad del EPC- β CD_(10 ciclos), la que probablemente se deba a la formación de los complejo de inclusión de la LD y la MT con la β CD.

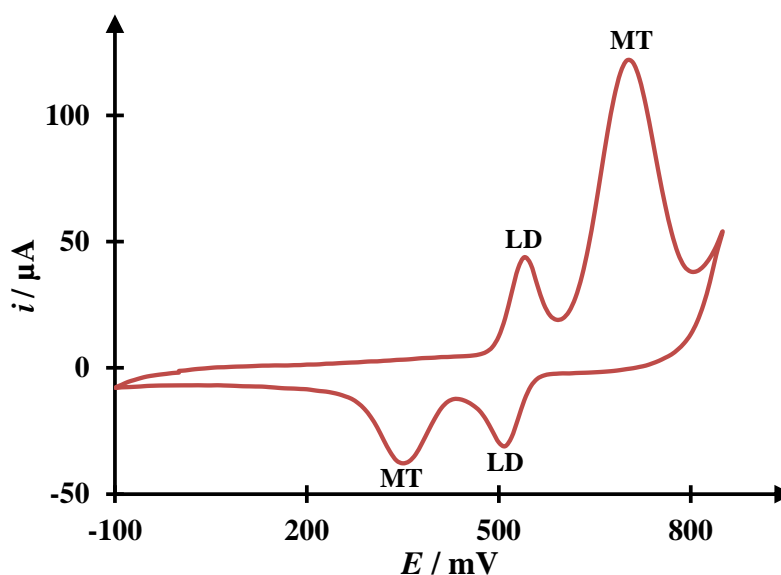


Figura 9.13. Voltamperograma cíclico del sistema EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.07 mM de LD y 0.07 mM de MT en HClO₄, pH 3, a 50 mVs⁻¹.

En la Figura 9.14, se muestra el voltamperograma cíclico obtenido para un sistema EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.04 mM de MT y 0.04 de LD en 0.001 M de HClO₄ (pH3), donde no se renueva la superficie. En el VC se observan los picos de oxidación y de reducción correspondientes a la MT y la LD, además del pico correspondiente a la oxidación del derivado indólico 4,5-dihidróxido, que se forma a partir de una reacción química acoplada al sistema (MT_{subpro}). A pesar de la aparición del pico de oxidación del subproducto, el EPC- β CD_(10 ciclos) sigue mostrando una buena selectividad hacia la LD y la MT.

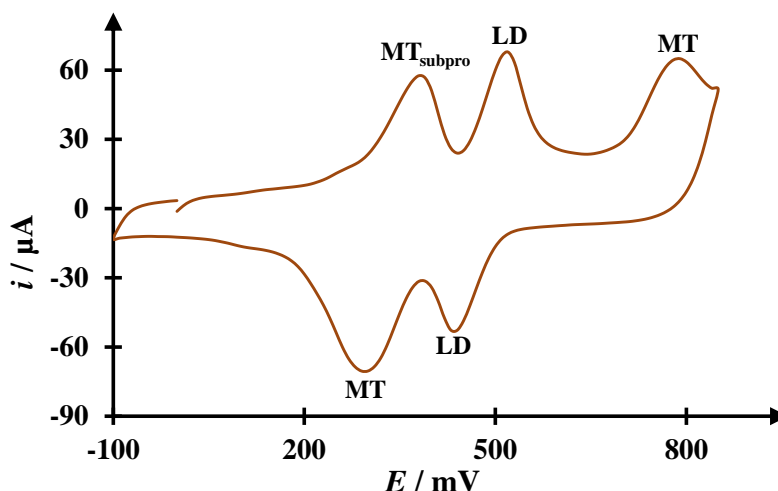


Figura 9.14. Voltamperograma cíclico del sistema EPC- β CD_(10 ciclos)/ 0.07 mM de LD y 0.07 mM de MT en HClO₄, pH 3, a 50 mVs⁻¹.

Mediante la modificación del EPC con β CD, es posible separar las señales de la MT y la LD, por lo que se prosigue con los estudios de voltamperometría diferencial de pulso, con el propósito de obtener un método para la detección simultanea de los dos neurotransmisores.

9.2.2 Estudio de voltamperometría diferencial de pulso usando un EPC- β CD

Para la determinación de la MT y la LD usando un EPC- β CD_(10 ciclos), se realizaron diversos estudios; sin embargo la MT no mantuvo un comportamiento estable, probablemente debido a que la LD forma un complejo de inclusión con la β CD más estable, en comparación con el complejo que forman la MT y β CD. Por esta razón, al variar la concentración de la MT, no fue posible obtener un método que permite realizar una determinación confiable de la MT en presencia de la LD. En cambio, fue posible obtener una curva de calibración para determinar la LD en presencia de la MT. La Figura 15(a), presenta los VDP para el sistema: EPC- β CD_(10 ciclos)/ x mM de LD y 0.005 de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH3), donde x varía de 0 a 0.15 mM. La Figura 15(b) muestra la ampliación de los picos de la LD, en donde se observa el incremento de la corriente al aumentar la concentración de la LD.

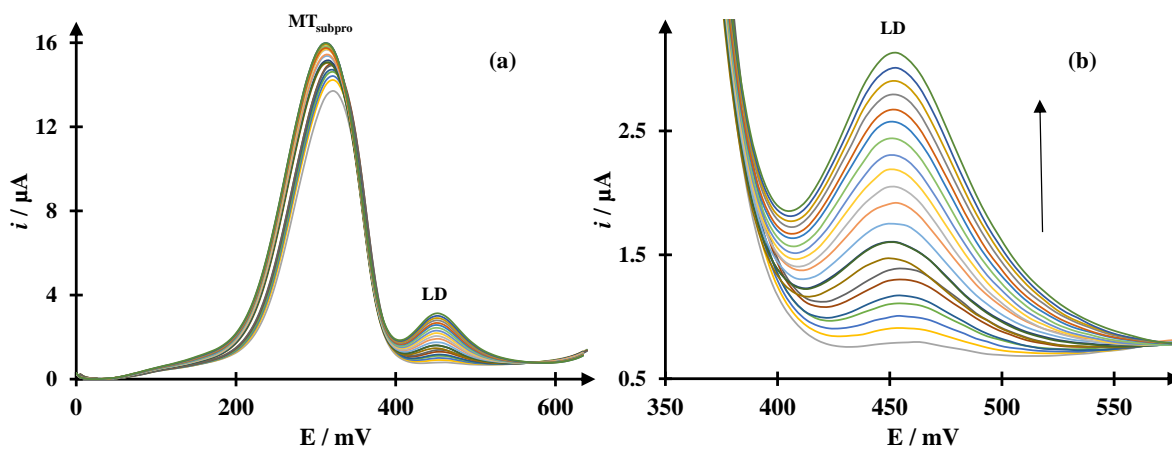


Figura 9.15. Voltamperogramas diferenciales de pulso para el sistema EPC-βCD_(10 ciclos) / x mM LD y 0.015 mM de MT en 0.001 M de HClO₄ (pH 3) a 20 mVs⁻¹, donde x varia de 0 a 0.3 mM.

A partir de los VDP de la Figura 9.15, se construye la gráfica de la i en función de la concentración de la LD. En la curva i vs [LD] de la Figura 9.16, se observa una correspondencia lineal, cuyo comportamiento se describe mediante la siguiente ecuación:

$$i_{pa}(\mu A) = (55.626 \pm 0.487)(\mu A \text{ mM}^{-1})[MT] + (0.314 \pm 0.012)(\mu A) \quad (9.5)$$

con un R^2 de 0.999.

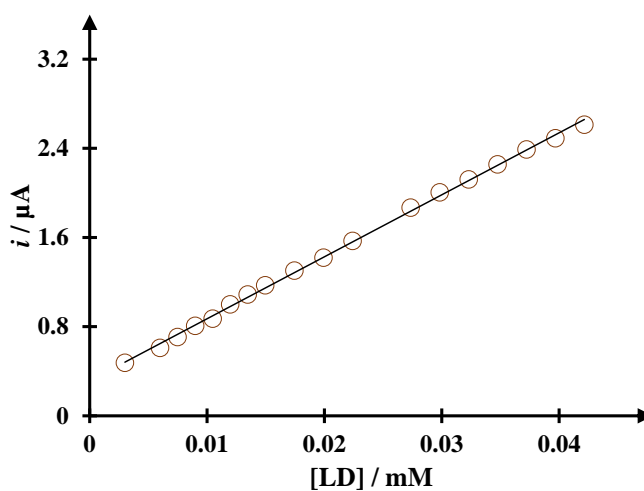


Figura 9.16. Gráfica de la i en función de la concentración de la LD en 0.001 M de HClO₄ (pH 3), usando un EPC-βCD en presencia de 0.005 mM de MT. Gráfica construida a partir de los datos de la Figura 9.15.

La Tabla 9.2, muestra los parámetros analíticos de las curvas de calibración [7], para la detección de la LD en presencia de MT usando un EPC- β CD_(10 ciclos). También se presentan los parámetros analíticos de las curvas de calibración para detección de MT utilizando un EPC y un EPC- β CD_(10 ciclos).

Tabla9.2. Datos obtenidos de las curvas de calibración de la LD en presencia de MT a un pH 3.

Electrodos	m / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	LOC* / μM	LOQ** / μM	I-L / μM
EPC-BCD _(10 ciclos)	56	1	5	3 - 42

*LOD: $3\sigma_{y/x} + b$

**LOQ: y $10\sigma_{y/x} + b$

9.3 conclusiones

Al usar los EPC modificados con β CD se mejoró la sensibilidad del electrodo, aumentando la intensidad de corriente; también se mejoró la selectividad logrando separar los picos de la MT y L-D, este comportamiento se debe la formación de complejos de inclusión de los neurotransmisores con la β CD, probablemente con una mayor preferencia hacia la LD. Además, se logró proponer un método para la cuantificación de la LD en presencia de la MT.

9.4 Referencias

- [1] A. Babaei, A.R. Taheri, M. Aminikhah, Nanomolar simultaneous determination of levodopa and serotonin at a novel carbon ionic liquid electrode modified with Co(OH)₂ nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes, *Electrochim. Acta.* 90 (2013) 317–325.
- [2] A. Benvidi, A. Dehghani-Firouzabadi, M. Mazloum-Ardakani, B.-B.F. Mirjalili, R. Zare, Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid and folic acid, *J. Electroanal. Chem.* 736 (2015) 22–29.

- [3] C. Zapata-Urzueta, M. Pérez-Ortiz, M. Bravo, A.C. Olivieri, A. Álvarez-Lueje, Simultaneous voltammetric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration, *Talanta*. 82 (2010) 962–968.
- [4] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, 329 (2007) 1–11.
- [5] R. Martínez, M.T. Ramírez, I. González, Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response, *Electroanalysis*. 10 (1998) 336–342.
- [6] G. Roa Morales, T. Ramírez Silva, L. Galicia, Carbon paste electrodes electrochemically modified with cyclodextrins, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 355–360.
- [7] J.N. Miller, J.C. Miller, Estadística y quimiometría para química analítica, Cuarta edi, Prentice Hall, Pearson Educación, S.A. Madrid, 2002.

Conclusiones Generales

Los estudios espectrofotométricos de la MT, mostraron que al proteger la molécula de la luz y mantener una atmósfera de N_2 , ésta se mantiene estable con el tiempo. De esta forma, se establecieron las condiciones de trabajo que permitieron calcular las constantes de acidez de la MT en medio acuoso de manera más exacta y obtener un método confiable para la cuantificación de la MT. Al estudiar las interacciones entre las distintas especies de la MT y la β CD mediante espectrofotometría, se comprobó la formación del complejo de inclusión.

La caracterización electroquímica de los electrodos de trabajo, permitió comprobar la formación de las distintas películas sobre la superficie de éstos para su modificación. Además, fue posible obtener los valores de capacitancia y área electroactiva de los distintos electrodos, dando valores mayores para el EPC modificado con $NPsAu\cdot\beta CD$. Al estudiar la influencia de los distintos factores que afectan su polimerización, se encontró que ésta se ve favorecida al aumentar el número de ciclos aplicados, un potencial de inversión mayor y al aumentar la concentración de protones.

El estudio del comportamiento electroquímico de la MT sobre un EPC, demuestran que el proceso de oxidación de la MT está controlado por la difusión y que no se ve afectado por la formación del subproducto que se forma mediante la reacción química acoplada al proceso. Mediante voltamperometría de corriente muestreada y diferencial se estimó el número de electrones involucrados en el proceso de oxidación de la MT. Utilizando voltamperometría cíclica y cronoamperometría en estado estacionario, así como voltamperometría lineal de disco rotatorio en condiciones de convección forzada fue posible calcular el coeficiente de difusión, encontrando valores muy cercanos entre ellos. Por otro lado, al estudiar el comportamiento electroquímico de la MT sobre los distintos EPC modificados, se encontró, que al modificar el EPC con 15 y 25 ciclos de βCD o $NPsAu\cdot\beta CD$, la oxidación de la MT cambia de un proceso controlado por la difusión a un proceso mixto; la contribución de la adsorción, como el aumento de la corriente y la forma gaussiana de los picos, se atribuyen a la formación del complejo de inclusión entre la MT y la βCD .

Finalmente, los resultados muestran que el EPC- β CD_(15 ciclos) y EPC-NPsAu• β CD_(15 ciclos), son una buena alternativa en la determinación de la MT en muestras sintéticas a un valor de pH 3, ya que mejoran la sensibilidad. Aunado a esto, la modificación del EPC con β CD, permite cuantificar la LD en presencia de MT.

Perspectivas Futuras

A partir de los resultados y discusiones presentadas en la presente Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros son las siguientes:

- En primer plano, realizar los cálculos de la constante de velocidad heterogénea, así como del coeficiente de transferencia para el proceso de oxidación de la MT.
- Realizar un estudio electroquímico mediante espectrofotometría de impedancia electroquímica, que permita realizar la estimación del espesor de las películas formadas sobre la superficie del EPC para su modificación.
- Comprobar la formación del complejo de inclusión del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ con βCD en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis y voltamperometría cíclica, además de realizar los cálculos de la constante de formación de los complejos de inclusión en solución y superficial.
- Realizar la determinación cuantitativa de la MT en pastillas y orina sintética utilizando el EPC sin modificar y modificado con βCD y $\text{NPsAu}\cdot\beta\text{CD}$.

Anexo A. Espectrofotometría UV-Vis y SQUAD

A.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible

La espectrofotometría de absorción en la región ultravioleta y visible (UV-Vis) del espectro electromagnético, es posiblemente de todas las técnicas espectrofotométricas, la más utilizada en la práctica del análisis cuantitativo, así como en el estudio del comportamiento químico de distintas moléculas. La técnica consiste en incidir un haz de luz sobre una muestra con la sustancia de estudio, la fuente de radiación emite luz en la región UV (200-400 nm; 595-299 kJ mol⁻¹) y Vis (400-800 nm; 299-149 kJ mol⁻¹) del espectro electromagnético (Figura A.1). Dicha muestra absorbe las radiaciones electromagnéticas y esta absorción depende la estructura electrónica de las moléculas que contenidas en el analito.

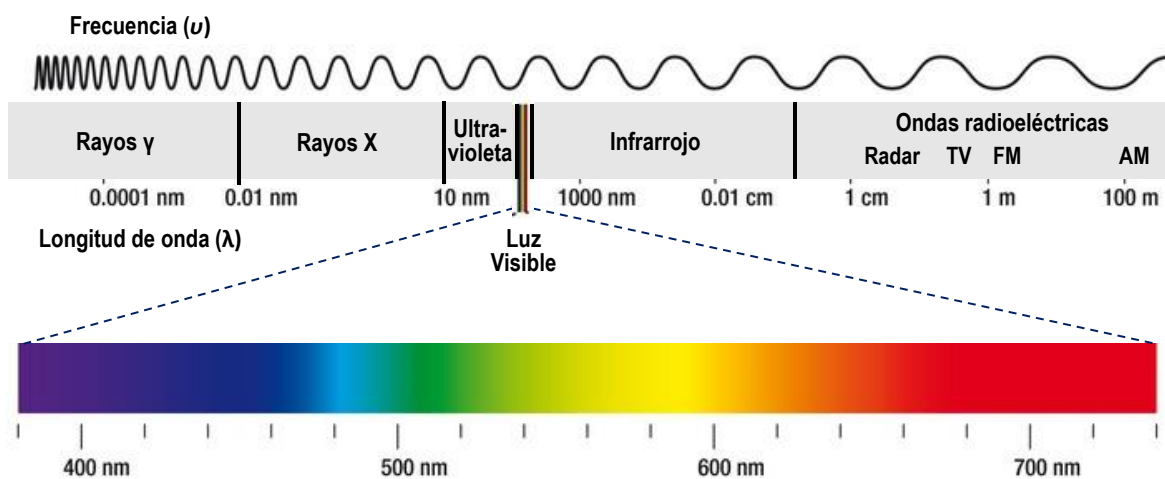


Figura A.1. Espectro electromagnético.

La energía absorbida es el resultado de las transiciones electrónicas, debidas a la excitación de electrones que pasan de un orbital molecular de menor energía a uno próximo de mayor energía. Las diversas regiones del espectro corresponden a diferentes clases de transiciones en el átomo o la molécula.

La diferencia de energía entre el estado excitado (E_2) y el estado basal (E_1) corresponderá a una determinada frecuencia (ν) o longitud de onda (λ) de una radiación electromagnética. La relación entre la energía de transición y la frecuencia está dada por la ecuación:

$$\Delta E = h\nu$$

La intensidad de luz absorbida por el analito es la transmitancia (T), que se define como la relación entre la cantidad de luz transmitida (I) y la cantidad de luz que incidió sobre la molécula de estudio (I_0):

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La cantidad de luz que absorbe una muestra, se calcula mediante la absorbancia (A_b), la cual se define como:

$$A_b = -\log T$$

En espectrofotometría la A_b es muy importante, debido a que ésta es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente en la muestra, de acuerdo con la ecuación de Lambert-Beer [1,2]:

$$A_b = \epsilon bc$$

Donde:

A_b : es la absorbancia y es adimensional

ϵ : es el coeficiente de absortividad molar que es función de la λ de la radiación de excitación, característico de cada especie de la muestra, expresado en $M^{-1}cm^{-1}$

b : es la longitud de paso óptico de la celda, generalmente de 1 cm

c : la concentración de la especie de estudio en la muestra, expresada en $mol\ L^{-1}$

A.1.1 Resonancia del plasmón superficial

A partir de la técnica de espectrofotometría UV-Vis es posible caracterizar las NPsAu, debido a la resonancia localizada de plasmón de superficie (Figura A.2), que se produce al incidir un haz de radiación sobre las nanopartículas. Esto se traduce, en la absorción de radiación electromagnética de las nanopartículas en una determinada zona del espectro visible, ocasionando la oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal, lo que da lugar a espectros con bandas de resonancia del plasmón superficial, RPS.

La longitud de onda a la que se obtienen las bandas de RPS, depende tanto del tamaño como de la forma y cristalinidad de las NPsAu, así como las diferentes coloraciones de las

dispersiones las nanopartículas. Este fenómeno, es una propiedad característica de superficies de un tamaño determinado; por lo que no es posible observar las bandas de RPS en partículas de tamaño inferior a 1-4 nm, ya que sus electrones están en niveles de energía discretos [3].

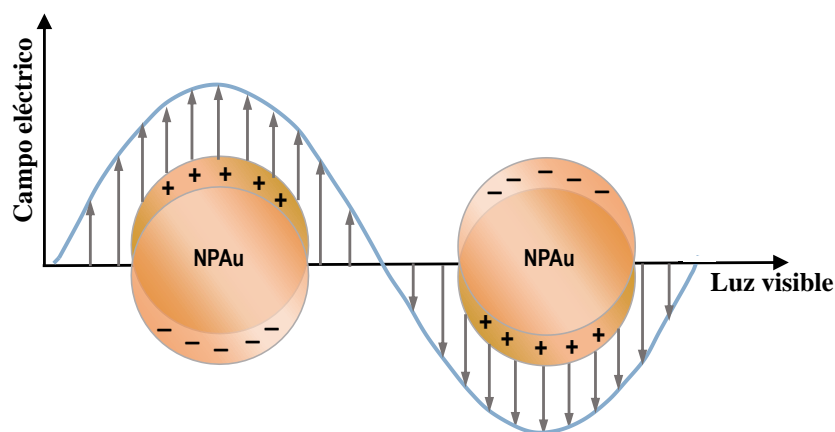


Figura A.2. Efecto de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) en las NPAu como una respuesta de la luz que incide sobre estas.

A.2 SQUAD

SQUAD (Stability Quotients from Adsorbance Data) es un programa computacional escrito en lenguaje Fortran, diseñado para calcular los valores de las constante de estabilidad en modelos de equilibrio químico. El programa puede emplearse para estudiar sistemas hasta de cinco componentes, que involucren diversos equilibrios químicos como: ácido-base, hidrólisis de iones metálicos, complejos mixtos de metales con ligandos, complejos protonados o hidroxocomplejos, complejos de inclusión, entre otros.

Las constantes de estabilidad se refinan, a partir de datos espectrofotométricos para un modelo químico con diferentes especies, cuya fórmula general es $M_p L_q H_r$, donde los coeficientes estequiométricos p , q y $r \geq 0$ y r es positivo para H^+ o negativo para iones OH^- . Las constantes de equilibrio para la especie $M_p L_q H_r$ están dadas por la siguiente expresión:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r}$$

Para realizar el refinamiento SQUAD considera las ecuaciones de balance de balance de masa; así como la Ley de Lambert-Beer, donde la absorbancia $A_{i,k}$ para cada especie j en una solución i a una longitud de onda k está dada por la ecuación:

$$A_{i,k} = b \sum_1^j \epsilon_{k,j} C_j = b \sum_1^j (\epsilon_{pqr,k} \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r)_j$$

donde b la longitud de paso óptico de la celda, $\epsilon_{pqr,k}$ es el coeficiente de absortividad molar y C_j la concentración para las especies $(M_p L_q H_r)_j$ a cada longitud de onda k .

Para que SQUAD compute los valore de estabilidad es necesario introducir al archivo de entrada los siguientes datos:

- Un modelo químico que considera los posibles equilibrios químicos del sistema de estudio
- Una propuesta de los valore de las constates globales de formación $(\log \beta_{pqr,j})$
- El intervalo de longitudes de onda k
- El pH de cada una de las soluciones i
- Las concentraciones de las soluciones C_j
- Las absorbancias observadas a cada k para cada i en función de la C_j y el pH

A partir de la información suministrada, SQUAD cálculo los valores de las constantes de formación globales, minimizando la suma de residuales al cuadrado entre los valores de las absorbancias observados experimentalmente y los valores de absorbancia calculados por el programa, U ; empleando el algoritmo de minimización Gauss-Newton:

$$U = \sum_1^i \sum_1^k (A_{i,k}^{obs} - A_{i,k}^{cal})^2$$

Los resultados se presentan en un archivo de salida que reporta: los valores de las constantes de equilibrio $\log \beta_{pqr,j}$, los coeficientes de absortividad $\epsilon_{pqr,k}$ para cada especie j presente en el sistema, con su desviación estándar y el valor final de U [4–7].

A.3 Referencias

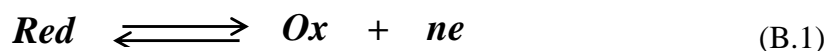
- [1] C. Gary D, Química Analítica, Sexta edic, Mc Graw Hill, 2009.
- [2] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principios de análisis instrumental, Mc Graw Hill, 2001.
- [3] M.G. Friederici Muñoz, Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas, Universidad de Barcelona, 2013.
- [4] D.J. Legget, Computational methods for the determination of formation constants, Plenum press, New York, 1995.
- [5] A.E. Sánchez-Rivera, S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, M.A. Romero-Romo, Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 59 (2003) 3193–3203.
- [6] Balderas-Hernández, Patricia, Estudio de especiación de indicadores ácido-base de la familia de las sulfonftaleínas, en medio acuoso, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 2004.
- [7] A. Sierra-Zenteno, Determinación de las constantes de acidez del 2-(aminometil)bencimidazol por RMN de C 13, espectrofotometría y potenciometría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2002.

Anexo B. Técnicas electroquímicas

B.1 Fundamentos

La electroquímica es una rama de la química, que estudia los cambios químicos generados por el paso de una corriente eléctrica, así como la producción de energía debida a una reacción química. Principalmente, su investigación se centra en el estudio de los procesos electródicos que ocurren en el electrodo de un sistema electroquímico, como respuesta a una perduración eléctrica.

Los procesos electródicos consisten en una reacción heterogenia que involucra la transferencia de carga. Esta reacción, también conocida como redox ocurre en un sistema de tres electrodos (trabo, referencia y contraelectrodo) que se sumergen en una celda que contiene un electrolito soporte. Estrictamente, un electrodo se define como la interface entre un conductor electrónico y un conductor iónico, donde se llevan a cabo los procesos electródicos. Suponiendo que en el electrodo se produce una reacción electroica general, donde hay una conversión de la especie reducida disuelta (*Red*), a una forma oxidada (*Ox*):



En la reacción la velocidad de la electrolisis es proporcional a la velocidad de la corriente farádica (transferencia de carga):

$$v_{rx} = \frac{i}{nFA} \quad (B.2)$$

donde v_{rx} es la velocidad en $mol\ s^{-1}cm^{-2}$, i la corriente en A, n el número estequiométrica de electrones transferidos, F es la constante de Faraday. La velocidad de transferencia de carga de las reacciones heterogéneas, generalmente depende de la transferencia de masa hacia el electrodo y varios efectos de superficie, además de algunas variables cinéticas. Al aplicar un potencial al sistema (E), es posible favorecer la velocidad de la reacción en el sentido de la oxidación o reducción. El E aplicado necesario para que se lleve a cabo una reacción redox a cierta velocidad, se conoce como sobre potencial (η) y se define como la diferencia entre e

valor del E_{eq} de la celda en equilibrio y el valor del E cuando hay un paso de corriente farádica:

$$\eta = E - E_{eq} \quad (B.3)$$

Considerando que la reacción (B.1), está compuesta de una serie de pasos que causan la conversión de la especie *Red*, a una forma *Ox*; entonces, la velocidad (o corriente) de los procesos redox en el electrodo está gobernada por la velocidad de procesos como:

1. Transferencia de masa
2. Transferencia de carga en la superficie del electrodo
3. Reacciones químicas que preceden o siguen la transferencia de carga
4. Otras reacciones como: adsorción, desorción y electropolimerización

La Figura B.1, muestra el esquema de los posibles procesos involucrados en las reacciones electroquímicas que se llevan a cabo en el electrodo [1].

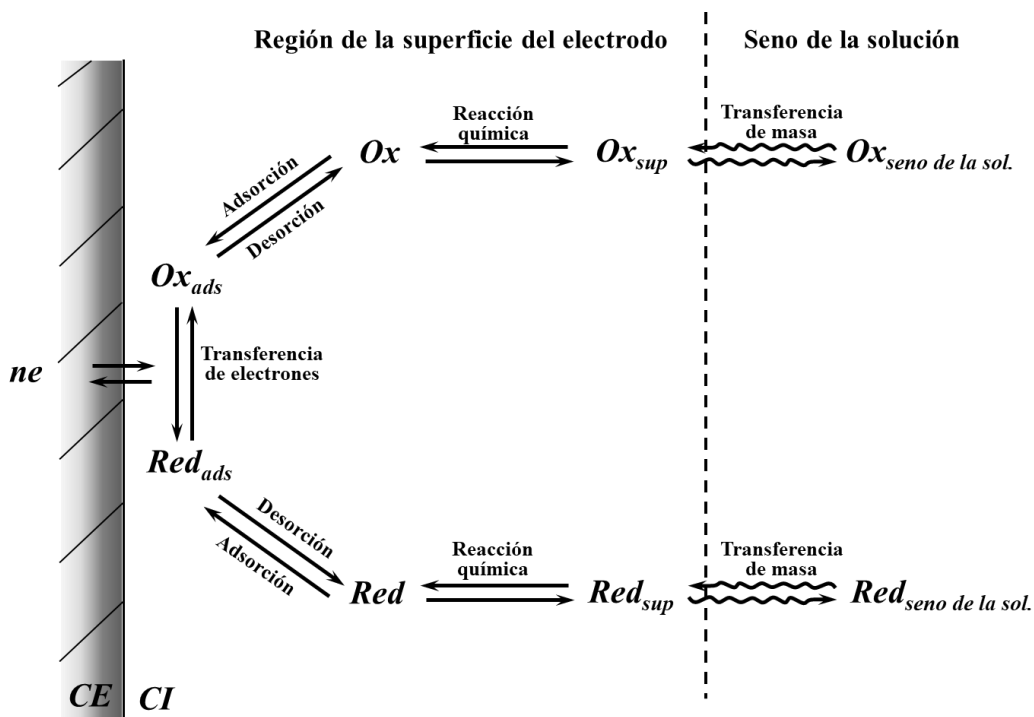


Figura B.1. Representación esquemática de los posibles procesos involucrados en las reacciones electroquímicas que se llevan a cabo en el electrodo.

Las reacciones electroquímicas más simples, son aquellas en las cuales la velocidad de las reacciones químicas asociadas, es muy rápida comparada con la velocidad de los procesos de transferencia de masa. Entonces, la velocidad de la reacción en el electrodo (v_{rxn}) está gobernada por la velocidad de transferencia de masa (v_{mt}):

$$v_{rxn} = v_{tm} = \frac{i}{nFA} \quad (B.4)$$

Estas reacciones son conocidas como reversibles o nernstianas y las formas de transferencia de masa de la especie hacia el electrodo son tres (Figura B.2) [1]:

1. *Migración*. Movimiento de un cuerpo cargado bajo la influencia de un campo eléctrico (un gradiente de potencial eléctrico).
2. *Difusión*. Movimiento de una especie bajo la influencia de un gradiente de potencial químico (p.e. un gradiente de concentración)
3. *Convección*. Transporte por agitación o hidrodinámico. Generalmente el flujo del fluido ocurre debido a la convección natural (convección causada por gradientes de densidad) y convección forzada.

La transferencia de masa para una reacción redox en el electrodo, está gobernada por la ecuación de Nerst-Planck, escrita para la transferencia de masa en una dimensión a lo largo del eje x como:

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (B.5)$$

donde $J_i(x)$ es el flujo de especies i en $\text{mols}^{-1}\text{cm}^{-2}$ a una distancia x de la superficie, D_i es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} , $\frac{\partial C_i(x)}{\partial x}$ es el gradiente de concentración a una distancia x , $\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$ es el gradiente de potencial, z_i es la carga adimensional, C_i la concentración de la especie i en molcm^{-3} y $v(x)$ es la velocidad en cms^{-1} , con la cual una especie en el seno de la solución se mueve hacia la superficie del electrodo a lo largo del eje [1].

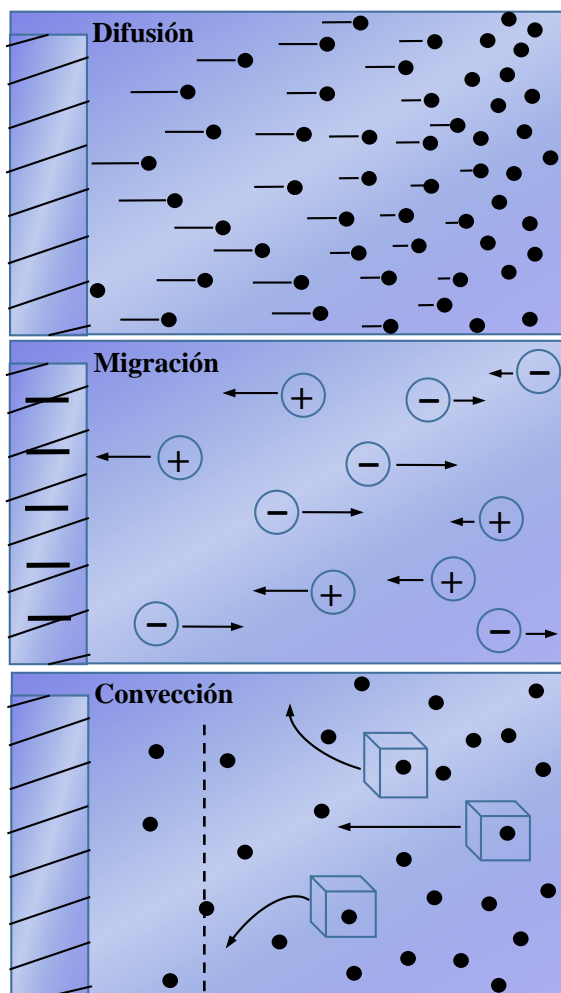


Figura B.2. Formas de transferencia de masa.

Debido a la dificultad que presenta el trabajar con un sistema electroquímico, que tenga las tres formas de transferencia de masa; éstos, frecuentemente se diseñan de manera que una o dos de las contribuciones sean despreciables. Por ejemplo, el procesos de migración puede ser reducido a niveles despreciables con la adición de un electrolito inerte (electrolito soporte) en una concentración mucho mayor a la de especie electroactiva. Mientras, que la convección puede ser evitada previniendo la agitación y las vibraciones en la celda electroquímica [1]. A continuación se presentas las distintas técnicas electroquímicas, que se emplearon en este proyecto.

B.2 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV), es una herramienta que permite observar el comportamiento de una especie electroactiva dentro de una ventana de potencial, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de procesos electroquímicos en diversas condiciones. La VC consiste en aplicar una señal de excitación, que variable con el tiempo, a un electrodo de trabajo en un sistema electródico. Esto provoca una respuesta de intensidad de corriente, i , característica del analito de estudio (especie electroactiva).

La señal de excitación, es un barrido de potencial lineal con forma triangular, en donde el potencial aplicado, E , incrementa linealmente en función del tiempo. El barrido varía desde un potencial inicial (E_o) hasta un límite predeterminado, conocido como potencial de inversión (E_λ), donde el sentido del barrido se invierte y regresa al E_o (Figura B.3).

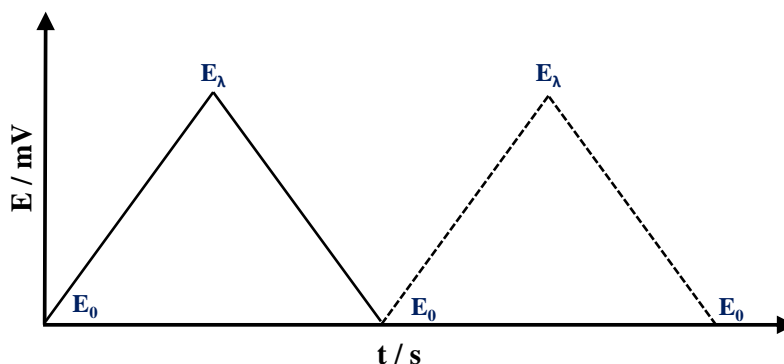


Figura B.3. Barrido de potencial aplicado, durante un experimento de VC.

El voltamperograma ciclico, se obtiene al graficar la intensidad de corriente en función del potencial aplicado (Figura B.4). Las curvas i - E , aporta información sobre los procesos redox de la especie electroactiva presente en el sistema de estudio como: el potencial pico anódico (E_{pa}), potencial pico catódico (E_{pc}), corriente del pico anódico (i_{pa}) y corriente del pico catódico (i_{pc}). A través del análisis de estos datos, es posible determinar si se trata de un proceso reversible o irreversible.

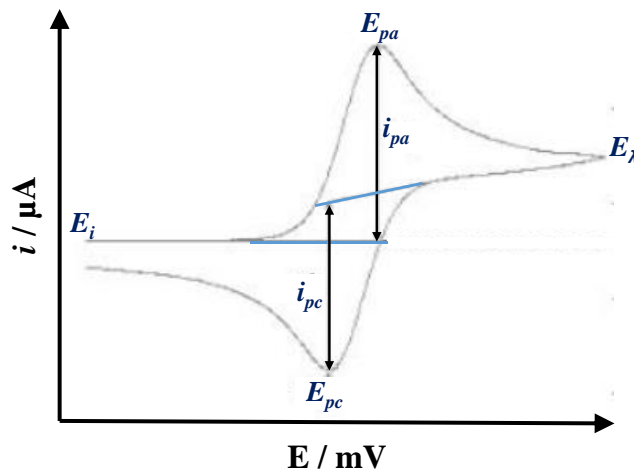


Figura B.4. Representación de un voltamperograma cíclico.

Utilizando la técnica de VC, es posible realizar un estudio en un amplio intervalo de velocidades de barrido de potencial; donde es posible percibir el comportamiento de los procesos redox entre el primer ciclo y los subsecuentes al variar la velocidad de barrido. A partir de los cambios que presentan los voltamperogramas con respecto de la velocidad barrido, es posible identificar si la transferencia de carga de los procesos redox está limitada por la difusión o adsorción. Para un sistema **reversible** controlado por la difusión (a 25°C), la expresión matemática de la corriente del pico, está dada por la ecuación Randlev-Sevsick:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{B.6})$$

donde n es el número de electrones en un mol, A es el área electroactiva del electrodo en cm^2 , C es la concentración en mol/cm^3 , v es la velocidad de barrido del potencial en Vs^{-1} y D es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} . Mientras que, para un proceso irreversible y quasi-reversible controlado por la difusión, donde el intercambio de electrones es lento, se tiene la siguiente ecuación:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{B.7})$$

donde α es el coeficiente de transferencia y n_a es el número de electrones involucrados en la transferencia de carga [2].

Para comprobar, si la transferencia de carga del proceso de estudio está controlada por la difusión, se construye una curva $i_p - \nu^{1/2}$ que debe ser lineal y pasar por el origen. Sin embargo, esto no siempre se cumple, debido a que la respuesta de la corriente en los voltamperogramas puede ser afectada por la presencia de especies adsorbidas. Para corroborar si el proceso de estudio es adsorptivo, se construye una segunda curva $i_p - \nu$ que debe ser lineal, de acuerdo con la ecuación:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A \nu}{4RT} \quad (\text{B.8})$$

donde Γ es el exceso superficial de la especie adsorbida antes de efectuar el barrido de potencial [2].

Si ninguno de estos dos criterios se cumple, se utiliza un tercer criterio que permite saber si la transferencia de la carga del proceso está controlado únicamente por difusión o existe un proceso de adsorción presente. Para ello, se construye una gráfica del $\log(i_p)$ en función de $\log(\nu)$; cuya pendiente tendrá un valor cercano a 0.5 si el comportamiento del proceso es de tipo difusivo, un valor de 1.0 si existe un proceso de adsorción en la superficie del electrodo y un valor de 0.6 a 0.9 si el proceso es mixto, es decir difusivo y adsorptivo al mismo tiempo [1–3].

B.3 Voltamperometría diferencial de pulso

La técnica de Voltamperometría Diferencial de Pulso (VDP), consiste en aplicar un pulso de potencial, al electrodo de trabajo, en una rampa de potencial lineal en un tiempo fijo. Para ello, se realizan dos medidas alternas, la primera justo antes de la aplicación del pulso (S_1) y al final de la aplicación (S_2), tal como se ilustra en la Figura B.5.

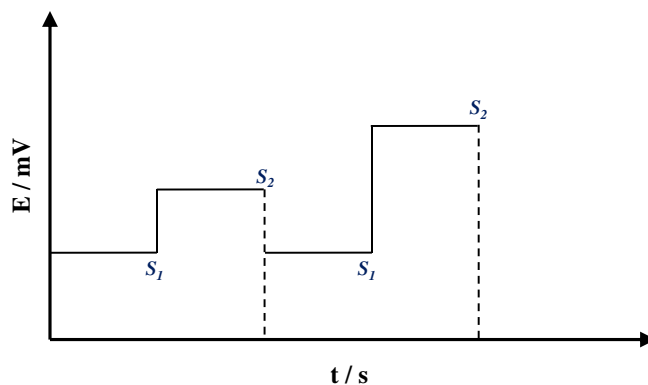


Figura B.5. Potencial diferencial de pulso aplicado, durante un experimento de VDP.

La importancia de usar la técnica de VDP, se debe a que minimiza los efectos de la corriente de capacitiva del electrodo de trabajo y mejora la señal-ruido. De esta manera, al graficar la diferencia de corrientes (S_1-S_2) en función del potencial aplicado, se obtiene una curva diferencial pulso (Figura B.6), cuyo corriente corresponde únicamente a los procesos redox. Por lo tanto, la altura del pico es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva ($i \propto C$), lo que permite la determinación de distintas especies electroactivas [1,2].

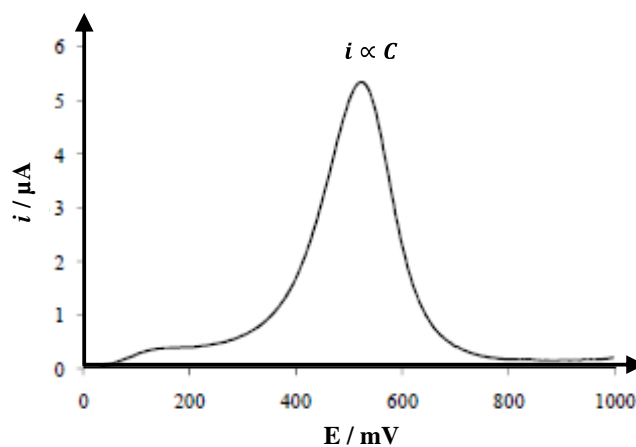


Figura B.6. Representación de un Voltamperograma diferencial de pulso.

Al graficar la i de pico observada en los VDP en función de la C de la especie electroactiva en el sistema, se obtiene una curva de calibración. Del ajuste lineal de la curva de calibración ($y = mx + b$), es posible obtener parámetros analíticos, que establecen la relación entre la

señal producida por un instrumento analítico y la concentración del analito como: los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), sensibilidad (m) e intervalo de linealidad. El ajuste de la curva i - C construida para un sistema electródico, queda de la siguiente forma:

$$i = mC + b \quad (\text{B.9})$$

donde b es la magnitud de la señal del blanco; mientras que m es la pendiente, que indica la sensibilidad del electrodo de trabajo hacia la especie electroactiva de interés.

Otra de las ventajas de utilizar un método que emplee esta técnica como instrumento de análisis, es su capacidad para detectar y determinar concentraciones muy bajas de algunos compuestos químicos en un intervalo de concentración (intervalo de linealidad). Capacidad que es posible evaluar, mediante la evolución estadística de sus límites de detección y cuantificación. El LOD de un analito, es la concentración que proporciona una señal de respuesta en el instrumento de análisis diferente a la señal del blanco. Por otro lado, el límite de cuantificación (LQ) es la concentración mínima que puede detectarse en el sistema y que puede ser cuantificada. La evolución de dichos límites, es posible empleando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = 3s_{y/x} + b = 3s_{i/C} + B \quad (\text{B.10})$$

y

$$LOQ = 10s_{y/x} + b = 3s_{i/C} + B \quad (\text{B.11})$$

donde B es el promedio de las mediciones del blanco y $s_{y/x}$ es la desviación estándar de las desviaciones del blanco [4].

Mediante un estudio de VDP variando la amplitudes de pulso (ΔE), es posible estimar el n cuando ΔE se aproxima a cero a 25 °C, de acuerdo con de acuerdo con Parry y Osteryoung [5] y Brett y Brett [6]. Para ello, se mide la amplitud del pico a la altura media de ($W_{1/2}$), de los voltamperogramas, donde $W_{1/2}$ está dado por la ecuación (6.10):

$$W_{1/2} = \frac{3.52RT}{nF} \quad (\text{B.12})$$

donde R es la constante universal de los gases, n es el número de electrones, T la temperatura y F es la constante de Faraday.

B.4 Voltamperometría lineal de disco rotatorio

La voltamperometría lineal (VL), consiste en realizar un barrido de potencial en un solo sentido, que va de un potencial inicial (E_0) a un potencia final (E_f) seleccionado, para obtener una respuesta en corriente. En la Figura B.7, se puede observar la representación de la señal de excitación, en donde el potencial aplicado varía linealmente con el tiempo.

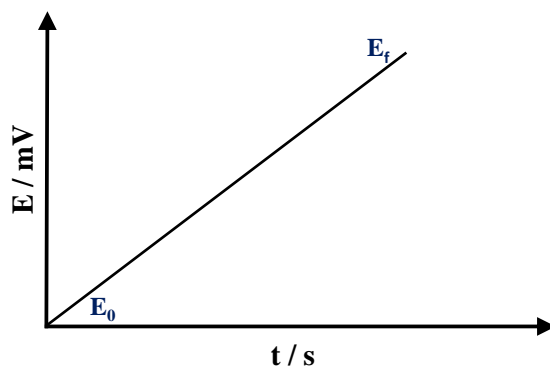


Figura B.7. Barrido de potencial aplicado, durante un experimento de VL.

El VL se obtiene al graficar la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, de igual forma que en la VC. La Figura B.8, muestra un voltamperograma lineal típico con un pico correspondiente a la reacción estudiada.

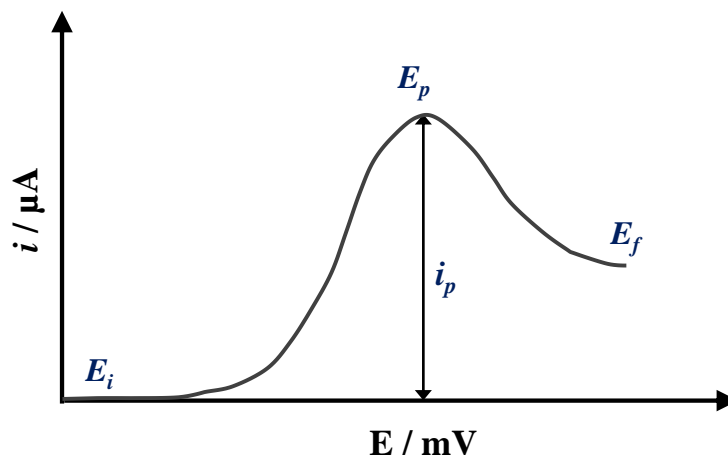


Figura B.8. Representación de un voltamperograma lineal.

En un sistema electroquímico, como ya se mencionó, la transferencia de carga en las reacciones redox está en función del potencial aplicado. Es decir, al aplicar un sobrepotencial la velocidad de transferencia de carga aumenta, sin embargo ésta sólo se transfiere a distancias muy cortas, por lo que se requiere de un proceso de transporte de masa que lleve la especie a la superficie del electrodo. Entonces, el proceso está limitado por el transporte de masa y la i obtenida es independiente del E y se denomina corriente límite (i_l) [1].

La técnica de VL se usa en combinación con la técnica de disco rotatorio (VL-DR), ya que permite estudiar la cinética y el mecanismos de los procesos redox, cuando la transferencia de carga está controlada por el transporte por de masa. Al rotar el electrodo, el comportamiento electroquímico de las especies en solución, no sólo está en función de la perturbación eléctrica sino también de la frecuencia de rotación, que determina el transporte de masa de la especie desde el seno de la solución hacia la interfase.

El uso de la VL-DR permite conocer el valor de la i_l y determinar el coeficiente de difusión (D) del proceso redox de estudio, mediante la ecuación de Levich (B.5), en donde i_l es directamente proporcional a $\omega^{1/2}$ para proceso totalmente controlado por la difusión:

$$i_{l,a} = 0.2nFAD^{2/3}C_{\mathbf{v}}^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (\text{B.13})$$

donde ν_c es la viscosidad cinemática, ω es la velocidad de rotación, F es la constante de Faraday, i_l es la corriente límite, n el número de electrones, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión y C la concentración del analito [1]. La Figura B.9, muestra una representación esquemática del voltamperograma típico obtenido con esta técnica [1,2].

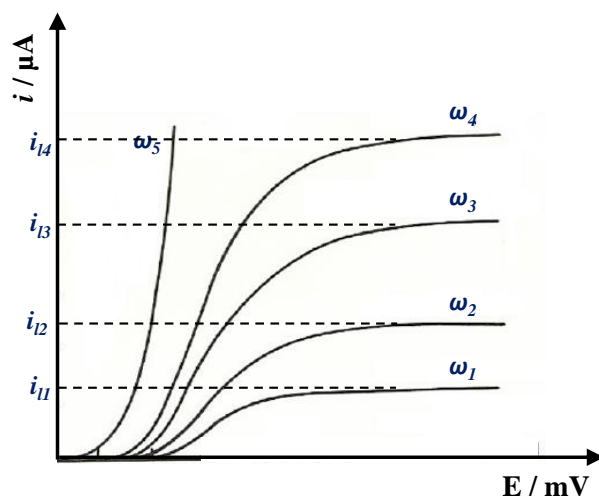


Figura B.9. Representación de la señal producida en la técnica de VL-DR a diferentes velocidades de rotación (ω_1 - ω_2).

B.5 Cronoamperometría

La cronoamperometría (CA), consiste en la imposición de un pulso constante de potencial al electrodo de trabajo, manteniendo al sistema condiciones de estado estacionario. Los cronoamperogramas se obtienen al registrar la señal de respuesta, es decir la corriente en función del tiempo.

Durante el experimento, se aplica a un sistema electródico un potencial (E_1) durante cierto tiempo (t_1), seguido de un segundo potencial aplicado (E_2), durante un tiempo (t_2) mayor (Figura B.10). Generalmente, E_1 es el valor de corriente nula para el sistema y E_2 es un valor donde una reacción de oxidación o reducción tiene una transferencia de carga muy rápida.

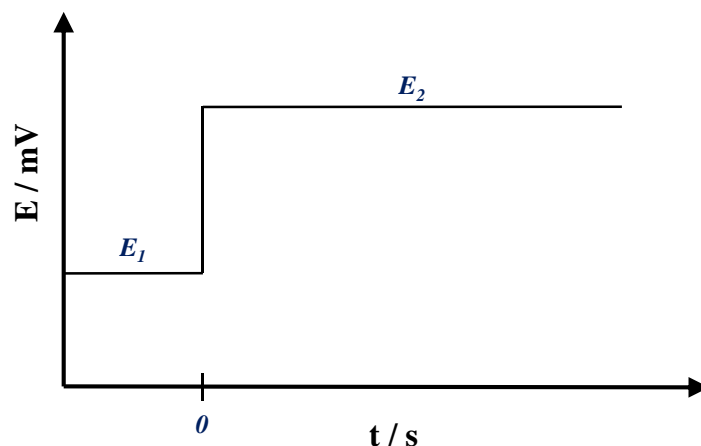


Figura B.10. Pulso constante de potencial aplicado, durante un experimento de CA.

En un CA, al inicio se aprecia la aparición de una corriente máxima como resultado del paso de E_1 a E_2 ; lo que implica la oxidación o reducción instantánea de la especie electroactiva que se encuentra en la interface. Posteriormente, la corriente máxima observada disminuye con el tiempo hasta estabilizarse; debido a que se genera un gradiente de concentración asociado al agotamiento de la especie, que a su vez produce un flujo neto de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo. Por lo que, se tiene que la transferencia de carga del proceso de estudio está controlado por la difusión. La Figura B.11, muestra un cronoamperograma típico, obtenido al aplicar un E por un tiempo t .

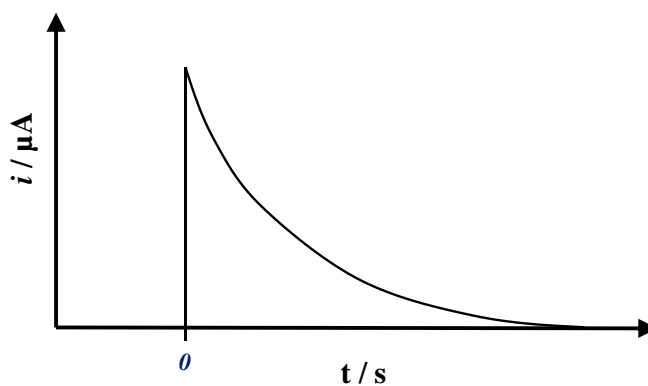


Figura B.11. Representación de un Cronoamperograma.

Mediante un estudio cronoamperométrico en condiciones estáticas y la ecuación de Cottrell (6.7), que describe la dependencia del i en función del $t^{1/2}$ para procesos controlados por la difusión, es posible estimar D .

$$i = nFACD^{1/2}\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (\text{B.14})$$

donde n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, A es el área electroactiva del electrodo en cm^2 , C es la concentración en mol/cm^3 , D es el coeficiente de difusión en cm^2s^{-1} y t el tiempo en s [1].

A partir de un estudio cronoamperométrico, también es posible calcular n , construyendo curvas de la $i - E$ (muestreada a diferentes tiempos, τ); de la cual se pueden obtener a su vez gráficas del $E - \log(i_l - i/i)$ a distintos τ , válidas para la ecuación de Nernst para sistemas controlados por la transferencia de masa:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} 2.203 \log\left(\frac{i_l - i}{i}\right) \quad (\text{B.15})$$

donde E es el potencial del electrodo, $E_{1/2}$ es el potencial de onda media, i es la corriente, i_l es la corriente límite, n es el número de electrones, T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases [1].

B.6 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

La técnica de espectroscopia impedancia electroquímica (EIE), consiste en perturbar al sistema de estudio con un potencial o corriente sinusoidal de frecuencia variable (tipo corriente alterna), para este caso se impone un potencial el cual puede expresarse de la siguiente forma:

$$E = \Delta E \text{ sen } \omega t \quad (\text{B.16})$$

donde E es el valor instantáneo del potencial, ΔE es la amplitud máxima y ω es la frecuencia angular. La respuesta a la perturbación, es una corriente y se expresa como:

$$i = \Delta i \text{ sen } \omega t \quad (\text{B.17})$$

Al aplicar un E sinusoidal de frecuencia variable a un electrodo de trabajo; el equipo procesa las mediciones de $E-t$ y $i-t$, dando valores de impedancia a cada frecuencia, lo que se denomina como espectro de impedancia. La impedancia (Z), se define como la relación del E aplicado entre i y representa la resistencia a la transferencia de carga en un circuito de corriente alterna, debido a la presencia de resistores, capacitores e inductores.

$$Z = \frac{E}{i} \quad (\text{B.18})$$

La impedancia resultante de un sistema, se representa median el diagrama de Nyquist, donde el eje horizontal representa la parte real de la impedancia (Z_{re}) del electrodo, es decir, su componente resistivo y el eje de ordenadas el componente imaginario (Z_{im}) o reactancia capacitiva. En un diagrama de Nyquist, el límite de Z_{re} a alta frecuencia, es el valor de la resistencia de la solución (R_{sol}); mientras que el límite de Z_{re} a bajas frecuencias, es la suma de la resistencia de la transferencia de carga (R_{tc}) y la resistencia de la solución. A partir de la frecuencia en la cima del semicírculo del diagrama de Nyquist y el valor de R_{tc} , puede calcularse la capacitancia (C_p) del sistema asociada a la doble capa. Para analizar los datos de EIE, la interfase electroquímica se ajusta a un “circuito equivalente” con elementos eléctricos pasivos como: resistencias, capacitancias, inductancias, entre otros. A pesar, de que hay una gran variedad de circuitos equivalentes que pueden cumplir con el comportamiento de una celda electroquímica, los componentes del circuito deben tener un significado físico que represente los fenómenos electroquímicos asociados con el sistema. Una vez que se tiene el circuito equivalente de la interface, es posible obtienen valores de diferentes parámetros eléctricos, usando los datos y un programa como Zview. La Figura B.12, presenta de un diagrama de Nyquist, con el circuito equivalente que reproduce los espectros de impedancia, que en este caso es el circuito Randles, en donde la resistencia de la solución R_{sol} , está conectada en serie a la resistencia de la transferencia de carga, R_{tc} , la cual a su vez, está en paralelo con la capacitancia de la interfase [1].

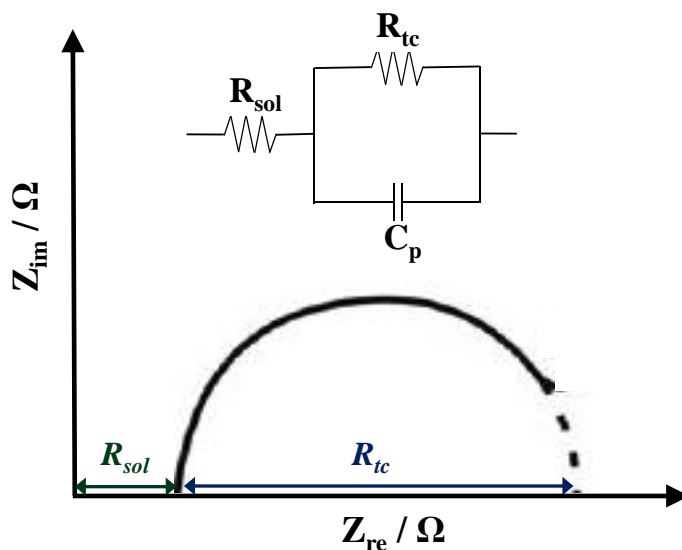


Figura B.12. Representación de un diagrama de Nyquist con el circuito equivalente que ajusta a la interfase del sistema.

B.7 Referencias

- [1] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, 2da. edici, JOHN WILEY & SONS, IN, United States of America, 2001.
- [2] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edit, John Wiley & Sons, 2006.
- [3] D.K. Grosser, *Cyclic Voltammetry, Simulation and analysis of reaction mechanisms*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, I, VCH Publishers, 1994.
- [4] C. Gary D, *Química Analítica*, Sexta edic, Mc Graw Hill, 2009.
- [5] E.P. Parry, R.A. Osteryoung, *Evaluation of Analytical Pulse Polarography*, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1634–1637.
- [6] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, 1st ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1993.